



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**MALÁRIA GRAVE: MARCADORES CLÍNICOS E
IMUNOLÓGICOS DE GRAVIDADE E PROGNÓSTICO**

Maria Lina Antunes

Tese para a obtenção do grau de Doutor em Medicina Tropical

Especialidade de Patologia Tropical

MAIO DE 2016



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**MALÁRIA GRAVE: MARCADORES CLÍNICOS E
IMUNOLÓGICOS DE GRAVIDADE E PROGNÓSTICO**

Maria Lina Antunes

Orientador: Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva

Coorientador: Professor Doutor Jorge Seixas

Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Doutor em Medicina Tropical.

Apoio financeiro do MINSA, República de Angola e Hospital Américo Boavida

MAIO DE 2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Investigador Doutor Marcelo Sousa e Silva, uma das pessoas mais organizadas que conheço, sempre solícito, e que ao longo destes quatro anos se transformou num amigo. A humildade e o bom senso acompanham a sabedoria.

Ao Prof. Doutor Jorge Almeida Seixas que representa a figura da autoridade, do rigor e decisão, o grande supervisor do ‘aquário’...

Ao grupo de estudantes de mestrado e do doutoramento que me acolheu de forma tão envolvente no “aquário” conseguindo limar as diferenças etárias e com quem aprendi muito sobre a arte do laboratório e sobre o domínio das novas tecnologias, especialmente às gentis Cláudia Moreno e Joana Monteiro.

Ao Paulo Fanado pela sua simpatia e disponibilidade, uma pessoa realmente bonita.

À Professora Doutora Cláudia Conceição que me deu sábios conselhos para o desenho do estudo nomeadamente no que se refere à definição dos objetivos e caracterização das variáveis a estudar.

À Investigadora Doutora Fátima Nogueira que gentilmente cedeu o extrato proteico total de *P. falciparum* utilizado no trabalho.

Ao Dr. Alexandre Teixeira, também sempre disponível, o meu precioso orientador nos primeiros passos na pesquisa bibliográfica e na inserção dos primeiros dados.

Ao meu amigo Prof. Doutor Humberto Ferreira, colega de liceu, que reencontrei em boa hora ao fim de longos anos e que rapidamente conseguiu apagar a distância entre nós, precioso e insubstituível colaborador na análise estatística dos dados.

Aos colegas e enfermeiros do Serviço de Cuidados Intensivos, com quem tenho uma história longa e pioneira na arte de cuidar de doentes críticos em Angola, particularmente à dedicada Dra. Deolinda Gaspar, pela sua ajuda na recolha e catalogação das amostras de sangue em tempo oportuno.

Á minha Diretora Geral, Dra Constantina Furtado Machado, a outra metade da minha laranja, que apesar da sobrecarga das tarefas da função de Diretora Clínica do HAB que simultaneamente desempenhei ao longo deste estudo, sempre me incentivou a progredir e autorizou a minha dispensa nos momentos cruciais, inclusive apoiando nos custos das viagens e ajuda nas estadias.

A todas as outras pessoas, anónimas neste documento, mas extremamente importantes na minha vida, pelo carinho, apoio incondicional e essencialmente pelo crédito que sempre depositaram no meu profissionalismo e bom desempenho.

Muito obrigado.

RESUMO

A malária grave, maioritariamente causada pelo *Plasmodium falciparum*, continua a ser uma das principais causas de morte por infeção no mundo, principalmente na África subsariana. A aquisição de imunidade na malária é lenta e para ser mantida requer a exposição a variantes antigénicas múltiplas do parasita e a maturação do sistema imune do hospedeiro. Existem evidências da imunidade protetora poder estar associada à intermutabilidade de classes e subclasses dos anticorpos gerados. Em Angola a malária foi a principal causa de morbilidade e mortalidade notificada em 2013. Muitos doentes autótones e residentes apresentam quadros clínicos com gravidade apesar de baixa parasitémia periférica observada na microscopia ótica. Com a finalidade de contribuir para o conhecimento da doença e da resposta imune humoral nos doentes com malária grave, foi efetuado um estudo observacional prospetivo de uma população de 101 doentes, internados no Serviço de Cuidados Intensivos (SCI) do Hospital Américo Boavida (HAB) em Luanda durante o período de 2 anos. A amostra por conveniência, incluiu doentes com 10 ou mais anos de idade, com diagnóstico de malária grave de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde confirmado por gota espessa e/ou teste rápido (TRD) e a presença de mais do que uma disfunção orgânica. A espécie infetante foi confirmada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os doentes foram caracterizados segundo o sexo, idade, naturalidade e residência e existência ou não de co-morbilidade. A gravidade e o prognóstico da doença foram avaliados segundo o SOFA *score* médio (média dos piores valores laboratoriais e fisiológicos obtidos diariamente nos três primeiros dias de internamento). O SOFA médio foi comparado com o SOFA_{max} e *delta*SOFA (diferença entre o valor máximo e mínimo do SOFA dos três primeiros dias de internamento). Para o estudo da imunidade específica foram doseados os anticorpos anti-*P. falciparum* (IgG, IgM e subclasses de IgG) no soro dos doentes em estudo, utilizando a técnica de imunoensaio enzimático (ELISA).

Todos os resultados obtidos foram relacionados com a parasitémia periférica, gravidade da doença e prognóstico utilizando o programa estatístico IBM SPSS versão 21.

A infeção por *P. falciparum* foi confirmada por PCR em todos os doentes em estudo e registou-se coinfeção com *P. malariae* em quatro dos doentes. Os doentes do presente estudo eram maioritariamente autótones e residentes, predominando o sexo masculino e com média de idade de 21 anos. A pontuação do SOFA médio foi de $8,92 \pm 3,81$. A mortalidade observada (16,8%) foi muito inferior à esperada pelo SOFA médio, principalmente nos doentes com pontuações mais elevadas. O *delta*SOFA manteve baixa capacidade de discriminação para a mortalidade observada nos doentes estudados com malária grave. Apesar da gravidade do quadro clínico, mais de metade dos doentes mostrou baixa parasitémia periférica ($\leq 2\%$) à admissão e não se encontrou correlação entre a parasitémia e a mortalidade. Os valores dos anticorpos IgG e IgM anti-*P. falciparum* estiveram elevados em todos os doentes em estudo, mas não se encontrou associação estatisticamente significativa com a parasitémia nem com a mortalidade.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*, malária grave, SOFA *score*, imunidade.

ABSTRACT

Severe malaria, mainly caused by *Plasmodium falciparum*, remains one of the leading causes of death by infection in the world, particularly in Sub-Saharan Africa. The acquisition of immunity in malaria is slow, and to be maintained, requires exposure to multiple antigenic variants of the parasite, and the maturation of the immune system with age. There is evidence that the protective immunity may be linked to the change of classes and subclasses of antibodies. In Angola the infection spreads throughout the territory, being malaria a major cause of morbidity and mortality reported in 2013. Many native and resident patients present clinical pictures with gravity in spite of low parasite counts by microscopy. With the goal of contributing to the knowledge of the humoral immune response in severe malaria patients, we have designed an observational prospective study of a population of 101 consecutive patients admitted to Intensive Care (ICU) of Américo Boavida Hospital (HAB) in Luanda during 2 years. By design, the sample included patients with more than 9 years old, with severe malaria diagnosis in accordance the World Health Organization criteria, confirmed by thick drop and/or quick test (RDT). The *Plasmodium* species was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Patients were characterized according to gender, age, birthplace and residence, and associated comorbidity. The severity of the disease was evaluated according to the average SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment) by the score obtained on the basis of daily worst data, for the first three days of hospitalization. The average SOFA, SOF_{Amax} and *delta*SOFA were compared. For the study of specific immunity, patient's sera antibodies anti-*P. falciparum* (IgG, IgM and IgG subclasses) were assayed by enzyme immunoassay (ELISA).

All results were related to parasite count, severity of the disease and prognosis using the statistical program SPSS 21 IBM.

The PCR confirmed *P. falciparum* infection in all studied patients. Four patients were found to exhibit *P. malariae* co-infection. The patients studied were mostly indigenous resident, predominantly male and with an average age of 21 years. The average SOFA score was 8.92 points with standard deviation 3,81 points. The observed mortality was 16.8%, and judged lower than expected by the average SOFA score, especially in patients with higher scores. *Delta*SOFA also showed low sensibility to mortality in the studied patients. Despite the severity of the clinical picture, more than half of the patients presented low peripheral parasitaemia ($\leq 2\%$) on admission and there was no correlation between the gravity and mortality by comparing the group of patients who died with those that survived. Both, anti-*P. falciparum* IgG and IgM antibodies, were elevated in all patients, but no correlation with periferic parasite density and mortality were observed.

Key Words: *Plasmodium falciparum*, severe malaria, SOFA score, immunity.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. MALÁRIA EM ANGOLA.....	3
1.2. TRANSMISSÃO DA MALÁRIA	5
1.2.1. O parasita	5
1.2.2. O vetor transmissor da malária	8
1.2.3. Ciclo biológico.....	9
1.3. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA MALÁRIA HUMANA	12
1.3.1. Diagnóstico clínico.....	12
1.3.2. Diagnóstico laboratorial	12
1.4. PATOGÉNESE DA MALÁRIA GRAVE	16
1.5. APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA GRAVE	22
1.6. RESPOSTA IMUNE CELULAR NA MALÁRIA GRAVE.....	30
1.7. IMUNIDADE HUMORAL ESPECÍFICA DO ESTÁGIO ERITROCITÁRIO	33
1.8. MEDIADORES SOLÚVEIS DA INFLAMAÇÃO.....	35
1.9. REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E AS IMPLICAÇÕES NA PATOGÉNESE DA MALÁRIA.....	40
1.10. TRATAMENTO DA MALÁRIA GRAVE	43
1.11. SCORES DE GRAVIDADE E PROGNÓSTICO QUE SÃO APLICADOS NAS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS	46
1.11.1. <i>Score</i> de gravidade e prognóstico específico para a malária grave nos adultos	48
II. OBJETIVOS	50
2.1. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS.....	51
III. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO	53
3.2. LOCAL DO ESTUDO	55

3.3.	DEFINIÇÃO DOS CRITÉRIOS DE MALÁRIA GRAVE	56
3.4.	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS LABORATORIAIS CLÍNICOS	56
3.5.	DIAGNÓSTICO DAS DISFUNÇÕES DE ÓRGÃOS E PROBABILIDADE DE MORTE NO CONTEXTO DA MALÁRIA GRAVE	57
3.6.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA POR MICROSCOPIA ÓTICA.....	60
3.7.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA POR TRD	60
3.8.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA PELA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	61
3.9.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA POR ELISA	63
3.9.1.	Determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium spp.</i>	63
3.9.2.	Determinação de subclasses e subtipos de anticorpos anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	64
3.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1.	CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	70
4.2.	DIAGNÓSTICO PRIMÁRIO DA INFECÇÃO	75
4.3.	ESTUDO CLÍNICO LABORATORIAL E DAS DISFUNÇÕES DE ÓRGÃOS.....	78
4.4.	EXAMES LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i>	99
V.	CONCLUSÕES.....	109
VI.	PERSPETIVAS FUTURAS	112
VII.	REFERÊNCIAS.....	115
VIII.	ANEXOS	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transmissão da malária em 2013 (adaptada e modificada de WHO 2013: Relatórios dos Programas nacionais de controlo da malária).....	8
Figura 2. Ciclo de vida das espécies de <i>Plasmodium</i> infectantes ao homem (adaptado de Abc da Medicina acessível em http://www.abcdamedicina.com.br/malaria-ciclo-de-contaminacao-profilaxia-sintomas-e-tratamento.html).	10
Figura 3. Distribuição da população estudada (n=101) por género.	70
Figura 4. Distribuição dos doentes estudados (n=101) por grupos etários.	71
Figura 5. Distribuição dos doentes estudados (n=101) pelo local e tempo de residência antes do internamento.	73
Figura 6. Associação de disfunções de órgãos na população estudada (n=101) segundo o SOFA <i>score</i>	84
Figura 7. Distribuição da pontuação do SOFA <i>score</i> médio nos doentes em estudo (n=101)....	85
Figura 8. Distribuição da pontuação do SOFA <i>score</i> médio nos 17 doentes falecidos e respetivas causas de morte.	86
Figura 9. Mortalidade observada nos doentes estudados (n=101) e a inferida pelo SOFA <i>score</i> médio.	88
Figura 10. <i>Output</i> do Programa SPSS21-IBM mostrando Curvas ROC das 3 variantes de SOFA <i>score</i> em função da mortalidade observada nos doentes do presente estudo (n=101).	89
Figura 11. Representação gráfica das 4 disfunções de órgãos identificadas na primeira análise por <i>clusters</i> e seu poder discriminante nos doentes em estudo (n=101).	90
Figura 12. Representação gráfica das 4 disfunções de órgãos identificadas na segunda análise por <i>clusters</i> e seu poder discriminante nos doentes em estudo (n=101).	91
Figura 13. Representação gráfica da proporção dos seis <i>clusters</i> (número 1 a 6) obtidos por análise multivariada com base nas quatro disfunções de órgãos mais discriminantes presentes nos doentes em estudo (n=94).	91
Figura 14. <i>Output</i> do programa SPSS21-IBM representando uma Curva ROC dos <i>Clusters</i> de disfunções em função da mortalidade observada no presente estudo (n=101).	92
Figura 15. Separação das variáveis (disfunções de órgãos) com poder preditivo e análise estatística dos <i>clusters</i> obtidos em relação à mortalidade observada/mortalidade esperada pelo SOFA <i>score</i> nos doentes estudados (n=101), figura obtida do Programa SPSS21-IBM	94

Figura 16. Regressão e correlação linear, nos doentes em estudo (n=101), entre os dois <i>scores</i> de gravidade e prognóstico SOFA e MAS.....	98
Figura 17. Dispersão dos valores obtidos no doseamento de anticorpos anti- <i>plasmodium spp</i> nos doentes em estudo (n=101).	99
Figura 18. Dispersão dos valores obtidos dos anticorpos IgG totais anti- <i>falciparum</i> nos doentes em estudo (n=101).	100
Figura 19. Dispersão dos valores obtidos no doseamento dos anticorpos IgM anti- <i>falciparum</i> nos doentes em estudo (n=101).	101
Figura 20. Representação gráfica da correlação entre os valores de IgG1 anti- <i>P.falciparum</i> e a densidade parasitária para o <i>cluster</i> atípico (n=7).	105
Figura 21. Representação da distribuição dos valores dos anticorpos IgG3 anti- <i>P.falciparum</i> em função da parasitémia periférica dos doentes em estudo.	106
Figura 22. Representação da distribuição dos valores dos anticorpos IgG4 anti- <i>P.falciparum</i> em função da parasitémia periférica do <i>cluster</i> 4.	106
Figura 23. Distribuição dos anticorpos IgG totais anti- <i>P spp</i> na população em estudo (n=101) considerando o local e tempo de residência.....	107
Figura 24. Relação entre os valores dos anticorpos IgG anti- <i>P.falciparum</i> entre os grupos de doentes semi imunes, não imunes e casos especiais dos doentes em estudo (n=101).	108

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas frequentemente disponíveis para detecção dos parasitas da malária no hospedeiro humano, adaptado de (Ochola <i>et al.</i> , 2006).	15
Tabela 2. Células e recetores melhor reconhecidos do hospedeiro, envolvidos na interação com os eritrócitos parasitados por <i>P. falciparum</i> (adaptado de Vásquez & Alberto Tobón, 2012).	19
Tabela 3. Sinais que caracterizam a Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica.....	47
Tabela 4. SOFA <i>score</i> acessível em http://clincalc.com/icumortality/sofa.aspx	58
Tabela 5. Pontuação SOFA e probabilidade de morte acessível em http://clincalc.com/icumortality/sofa.aspx	59
Tabela 6. Adaptado de Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A; <i>Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury</i> . Critical Care. 2007;11(2): R31.....	59
Tabela 7. Condições de reação da <i>nested</i> PCR utilizada para amplificar sequências específicas de <i>Plasmodium</i> spp em amostras de sangue.	62
Tabela 8. Sequências nucleotídicas (<i>primers</i>) utilizadas na <i>nested</i> PCR específicas para as espécies de <i>Plasmodium</i> spp. Os <i>primers</i> foram sintetizados pela companhia Thermo Scientific – Alemanha. Pb: pares de bases.	63
Tabela 9. Distribuição dos doentes estudados segundo co-morbilidade registada.	74
Tabela 10. Comparação das variáveis sociodemográficas entre os doentes sobreviventes e não sobreviventes de presente estudo (n=101).....	75
Tabela 11. Distribuição dos doentes estudados (n=101) pela densidade parasitária na gota espessa.	75
Tabela 12. Relação estatística entre o grupo dos doentes sobreviventes e o grupo dos falecidos em relação à parasitémia periférica média.	76
Tabela 13. Relação dos doentes com TRD falso negativo com a presença de patologia crónica e a evolução do internamento.	78
Tabela 14. Distribuição do valor da hemoglobina nos doentes estudados (n=101).....	79
Tabela 15. Distribuição dos valores das plaquetas na população estudada (N=101).	79
Tabela 16. Distribuição dos valores da ureia nos doentes estudados (n=101).....	80
Tabela 17. Distribuição dos valores da creatinina nos doentes em estudo (n=101)	80

Tabela 18. Distribuição dos valores das aminotransferases e bilirrubina total nos doentes em estudo (n=101)	81
Tabela 19. Comparação entre os valores médios laboratoriais obtidos nos doentes sobreviventes e falecidos.....	82
Tabela 20. Distribuição das disfunções de órgãos nos doentes em estudo segundo o SOFA <i>score</i>	83
Tabela 21. Registo do tratamento com técnicas invasivas nos doentes estudados (n=101).	85
Tabela 22. Causas de morte registadas nos doentes falecidos dos doentes estudados.....	86
Tabela 23. Comparação entre os doentes sobreviventes e falecidos em relação à ocorrência de disfunções de órgãos e suporte de vida com técnicas invasivas.	87
Tabela 24. Análise estatística da correlação entre os diferentes anticorpos IgG anti- <i>Plasmodium spp</i> e IgG IgM anti- <i>P. falciparum</i> em função da parasitémia periférica (<i>Output</i> do programa SPSS21.-IBM)	101
Tabela 25. Análise estatística da correlação entre os diferentes anticorpos IgG anti- <i>Plasmodium spp</i> e IgG IgM anti- <i>P. falciparum</i> em função da mortalidade (<i>Output</i> do programa SPSS21-IBM)	102
Tabela 26. Valores de anticorpos IgG anti- <i>Plasmodium spp</i> e IgG e IgM anti- <i>P. falciparum</i> obtidos nas amostras de sangue com TRD falsos negativos nos doentes em estudo (n=101). .	103
Tabela 27. Análise de variância da distribuição dos valores das subclasses dos anticorpos IgG anti- <i>P. falciparum</i> em associação com a parasitémia periférica dos doentes em estudo (n=101) obtida no <i>Output</i> do programa SPSS21-IBM.	104

LISTA DE ABREVIATURAS

- C3a - fragmento menor de C3 (componente do complemento)
- C5a – fragmento menor de C5 (componente do complemento)
- CDC – ‘Center for Disease Control’
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- ELISA - ‘enzyme linked immunosorbent assay’ ensaio imunoenzimático
- GINI – ‘Gross National Income’
- HAB – Hospital Américo Boavida
- H₂O₂ – peróxido de hidrogénio
- H₂SO₄ – ácido sulfúrico
- INF γ – interferon gama
- INEA – Instituto Nacional de Estatística de Angola
- IR – índice de reactividade
- MAS *score* - Malaria *score* for adults
- MOD – disfunção orgânica múltipla
- NO – óxido nítrico
- NOS – óxido nítrico sintase
- NK - natural killer
- ONU – Organização das Nações Unidas
- PBS – Phosphate Buffer Saline – solução salina tamponada com fosfato
- PBS-Tw20 – PBS contendo Tween 20 0,05%
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- PCR – proteína C reactiva
- PMI – President’s Malaria Initiative
- RDT – ‘Rapid Diagnostic Test’ teste rápido de diagnóstico
- SCI – serviço de cuidados intensivos
- SOFA *score* - Sequential Organ Failure Assessment
- SRIS – síndrome de resposta inflamatória sistémica
- TAE – tampão Tris-acetato – EDTA
- TPI – tratamento intermitente preventivo
- TNF α - factor de necrose tumoral alfa
- VIH – vírus da imunodeficiência humana
- UCI - unidade de cuidados intensivos
- UV – luz ultravioleta
- WHO – ‘World Health Organization’ organização mundial da saúde

I. INTRODUÇÃO

No último relatório do Programa Global da Malária da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014) afirma-se que a doença continua a ser um problema de saúde global com cerca de 40% da população do mundo, mais do que 3,3 mil milhões de pessoas, em risco de adquirir malária nos países onde existe a transmissão da doença. Adicionalmente, em 2012 (WHO, 2012), esta organização já chamou a atenção para o problema da infeção de grande número de pessoas de áreas não malarígenas que, com a facilidade de meios rápidos de transporte moderno, podem evoluir para doença grave depois do seu regresso a casa. Bruneel e colaboradores (2010) descrevem 400 doentes com malária grave importada utilizando um estudo coorte realizado entre 2000 e 2006 em 45 Unidades de Cuidados Intensivos em França; destes doentes 96% foram infetados na África sub-Sariana. Apesar da persistência deste panorama mundial, na última década, os investimentos globais na prevenção e controlo da malária criaram um momento único e salvaram mais do que um milhão de vidas (Pigott *et al.*, 2012). Em 2010, a média global de mortes por malária no mundo reduziu para um quarto, e em África para um terço (WHO, 2012). Nos últimos três anos, embora se continue a registar uma redução global dos casos e dos óbitos por malária em África (o registo dos óbitos reduziu 54% desde o ano 2000) (WHO, 2014), as metas internacionais para a redução dos casos e das mortes por malária não serão obtidas sem um progresso substancial nos países da região central onde a transmissão da infeção é estável (Steketee & Campbell, 2010). A transmissão da malária ocorre ainda em 97 países e a doença causou em 2013 um número estimado de 584.000 óbitos (com um intervalo de variação de 367.000 – 755.000 óbitos), 90% dos quais ocorreram nos países africanos principalmente entre crianças com menos de 5 anos de idade (78%) (WHO, 2014). A malária está fortemente associada com a pobreza. A taxa de mortalidade por malária é mais alta nos países com mais baixo *Gross National Income* (GNI). Países com maior percentagem da sua população vivendo na pobreza (menos de US\$ 1.25 por pessoa dia) têm mais alta mortalidade por malária. Nestes países com elevada prevalência em crianças, a mortalidade é mais alta nas populações mais pobres e nas áreas rurais (WHO, 2012).

O protozoário *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) é comum nos trópicos e pode causar as formas mais graves da doença. A infecção pode ser fatal na ausência de diagnóstico precoce da doença e das suas complicações; igualmente importante é a instituição precoce de tratamento apropriado, especialmente em grupos de alto risco, tais como as crianças mais pequenas e mulheres grávidas (WHO, 2012). *P. vivax* e *P. knowlesi* podem também causar infecção grave (Baird, 2013; Rajaharam *et al.*, 2012). Não estão descritas formas graves da doença causadas por infecções isoladas por *P. malariae* ou por *P. ovale*.

Por outro lado, a resistência dos parasitas aos agentes anti-maláricos continua a ser uma ameaça aos esforços globais para o controlo e eventual eliminação da malária. A possibilidade de emergência de resistência às artemisininas na sub-região do Mekong, analisada em 2013 pelo Comité Acessor da Política da Malária (WHO, 2014), embora ainda não determinada se real ou um artefato, causa particular inquietação em grupos de alto risco, tais como as crianças mais pequenas e mulheres grávidas, nos quais a eficácia do tratamento é crítica para a sobrevivência (WHO, 2012).

1.1 MALÁRIA EM ANGOLA

A República de Angola situa-se na região ocidental da África Austral, ocupando uma superfície de 1.246.700 km² sendo o terceiro país mais extenso da África sub-Sariana. O país é multicultural e multilingue e com um clima tropical, com duas estações: a estação seca de Maio a Setembro (cacimbo), e a das chuvas, de Outubro a Abril, com temperaturas médias de 17°C e 27°C, respectivamente. Em Maio de 2014 foi possível realizar o primeiro censo populacional desde a independência do país em 1975. Em Outubro de 2014 o Instituto Nacional de Estatística divulgou os resultados preliminares que apontam para uma população total de 24.383.301, com cerca de 52% de mulheres. A maior parte da população reside em área urbana (62,3%) e a província de Luanda registou 27% da população do país (Recenseamento Geral da População e Habitação 2014 acessível em <http://www.geohive.com/cntry/angola.aspx>). Estes dados preliminares ultrapassam significativamente as projeções da população efetuadas por várias fontes, particularmente da Divisão de População da Organização das Nações Unidas (ONU), projeções que foram calculadas com base nas taxas de crescimento dos

censos realizados na época colonial (Nzatuzola, 2012). Após várias décadas de conflito armado, o que geralmente se espera é que a paz venha permitir uma explosão demográfica caracterizada por uma taxa de natalidade muito elevada. Mas a esperança média de vida continua baixa (46 anos) resultado de uma taxa de mortalidade que ainda é muito elevada, principalmente nas crianças com menos de 5 anos de idade (166 mortes por 1.000) e das mulheres grávidas (1.400 mortes por 100.000 nascimentos) (Oliveira, 2012).

No Decreto Presidencial nº 262/10 de 24 de Novembro de 2010 (acessível no Diário da República de Angola I Série – Nº 222), que aprova a Política Nacional de Saúde (PNS), se reconhece que apesar da economia angolana se caracterizar por altos níveis de crescimento nos últimos anos, os índices de rendimento da população angolana são ainda muito baixos. O coeficiente de *Gini*, que mede o índice de pobreza de uma população, foi estimado para Angola em 2004 em 0,64. Fruto de um grande esforço do governo no combate à pobreza, o coeficiente *Gini* voltou a ser estimado em 2009 pelo Banco Mundial em 0,58, mas ainda 61% da população vive abaixo da linha de pobreza e 26% em pobreza extrema (PNS, 2010).

Na última década o país tem feito um esforço significativo para a melhoria dos indicadores de saúde, investindo na edificação e reparação de infra-estruturas, melhoria do equipamento das unidades de saúde a nível central, provincial e também municipal, formação e revisão das carreiras dos profissionais de saúde, qualificação salarial e particularmente no diagnóstico precoce e tratamento oportuno e adequado das doenças mais comuns.

O Relatório Anual de 2013 do Ministério da Saúde de Angola (MINSA) refere que as doenças transmissíveis são as principais causas de morbilidade e mortalidade no País. A malária, as doenças respiratórias agudas e as doenças diarreicas agudas somaram 86% do total das doenças notificadas no ano. Foram notificados 2.487.306 episódios de malária e 6.518 óbitos (letalidade específica 0,3%) (MINSA, 2013). Destes episódios relatados como malária 1.643.200 foram confirmados laboratorialmente (66%) (MINSA, 2013). O Plano Nacional de Controlo da Malária (PNCM) refere que em Angola estão identificadas três espécies de *Plasmodium* implicadas na transmissão da doença: *P. falciparum* (92%), *P. vivax* (7%) e *P. malariae* (1%). Os principais vetores

são os mosquitos dos complexos de *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus* (MINSA, 2006).

No que diz respeito às medidas de controlo da doença, Angola aderiu à iniciativa “Fazer Regredir a Malária”, uma campanha lançada pela WHO em 1998 e tem tido a ajuda do Fundo Global (*Global Fund to Fight Malaria*), entre outros parceiros. O PNCM foi elaborado com base em 6 componentes estratégicos, nomeadamente: (1) diagnóstico precoce; (2) tratamento imediato e adequado com anti-maláricos distribuídos gratuitamente, utilizando duas associações terapêuticas que incluem sempre os derivados da artemisinina (artusunato + amodiaquina/artmetheter + halofontrina); (3) tratamento preventivo das crianças com menos de 5 anos e das mulheres grávidas com a associação de sulfadoxina e pirimetamina (TPI); (4) o controlo dos vetores através da pulverização residual intra-domiciliária e dos espaços abertos; (5) distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticida; (6) o diagnóstico, controlo e prevenção de epidemias.

O diagnóstico rápido e o tratamento adequado e gratuito dos doentes sintomáticos com associações terapêuticas com derivados da artemisinina são as medidas basilares adotadas pelo PNCM para a redução da taxa de mortalidade e controlo da transmissão da doença, assim como para evitar o surgimento da resistência aos antimaláricos.

1.2 TRANSMISSÃO DA MALÁRIA

1.2.1 O parasita

A doença é provocada por um protozoário que pertence ao género *Plasmodium*, da família *Plasmodiidae*, filo *Apicomplexa*. Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium*, que podem infectar muitas espécies animais tais como os répteis, aves e vários mamíferos. Quatro espécies de *Plasmodium* são reconhecidas como capazes de causar infeção nos seres humanos: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* (Legorreta-Herrera & Sánchez-Cruz, 1999). Adicionalmente existe uma espécie (*P. knowlesi*) que infeta os macacos e que recentemente tem sido reconhecida como uma causa de malária zoonótica em seres humanos (Ramasamy, 2014).

As infeções por *P. vivax* são de distribuição mais extensa e mais frequentes globalmente, mas as infeções por *P. falciparum* são responsáveis por 100 milhões de casos clínicos anualmente e causam a vasta maioria dos episódios de malária grave no mundo (Enayati & Hemingway, 2010).

- *P. falciparum* é encontrado na área tropical e subtropical, predominantemente no continente Africano e continua sendo o principal responsável de 90% da mortalidade global por malária. A anemia severa e a malária cerebral são as complicações mais frequentes da doença e que se mantêm como um desafio, principalmente nos países da África Central (WHO, 2014).
- *P. vivax* é encontrado maioritariamente na Ásia, América Latina, América e alguns locais da África (Gething *et al.*, 2012). Pela alta densidade populacional, especialmente na Ásia, é provavelmente o parasita da malária humana mais prevalente. *P. vivax* (tal como o *P. ovale*) mantém esporozoítos em estado latente no fígado (hipnozoítos) que podem ativar e invadir o sangue por surtos durante vários meses ou anos depois da picada do mosquito infetado (Baird, 2013).
- *P. ovale* é também encontrado maioritariamente em África (especialmente na África oriental e nas ilhas do Oceano Pacífico). É biologicamente e morfológicamente muito similar ao *P. vivax*, mas contrariamente a este, pode infetar indivíduos que são negativos para o grupo de sangue Duffy, o que é frequente entre os residentes da África sub-Sariana (Howes *et al.*, 2011).
- *P. malariae*, encontrado em todo o mundo, é a única espécie do parasita humano da malária que tem um ciclo de três dias. As outras três espécies têm um ciclo terço (2 dias de febre). Se não tratado o *P. malariae* causa uma infeção crónica que em alguns casos pode permanecer toda a vida. Nalguns doentes crónicos infetados o *P. malariae* pode causar sérias complicações tais como um síndrome nefrótico (Nimri & Lanners, 2014).
- *P. knowlesi* é encontrado no Sudeste da Ásia como um patógeno natural de macacos de grande tamanho. Recentemente foi demonstrado que é causa de malária zoonótica nesta região, particularmente na Malásia. *P. knowlesi* tem um

ciclo de replicação até 24 horas e pode progredir de infeção não complicada para severa; foram relatados casos fatais pela infeção por esta espécie (Rajahram *et al.*, 2012).

A quantificação da transmissão da malária no mundo para classificar o risco da doença tem sido um conceito desafiador para os epidemiologistas. O Programa Global de Erradicação da Malária, coordenado pela WHO, tem procurado consenso entre os especialistas para medir a endemicidade da malária de modo a definir regras e ações para os programas de controlo da doença (Hay *et al.*, 2008).

De acordo com Hay e colaboradores (2008) há três diferentes situações epidemiológicas para avaliar a prevalência da malária numa população, nomeadamente:

- Áreas de alta transmissão: áreas hiperendémicas ou holoendémicas nas quais a prevalência de parasitémia por *P. falciparum* é cerca de 50% na maior parte do ano entre crianças entre 2-9 anos de idade. Nestas áreas, virtualmente todos os indivíduos expostos foram infetados na infância tardia ou na primeira infância.
- Áreas de moderada transmissão: áreas mesoendémicas nas quais a prevalência da parasitémia por *P. falciparum* é de 11-50% durante a maior parte do ano entre crianças com idades entre 2-9 anos. A prevalência máxima de malária ocorre na infância e adolescência, embora não seja rara a infeção ser adquirida apenas na idade adulta.
- Áreas de baixa transmissão: áreas hipoendémicas nas quais a prevalência de parasitémia por *P. falciparum* é de 10% ou menos durante a maior parte do ano entre crianças entre 2-9 anos de idade. A infeção por malária e a doença ocorre de modo similar com baixa frequência em qualquer idade, e se desenvolve uma baixa imunidade e as pessoas podem passar o resto da vida sem desenvolver a doença.

A figura 1 mostra, aproximadamente, quais as áreas onde existe registo de transmissão da malária no mundo e sua intensidade.

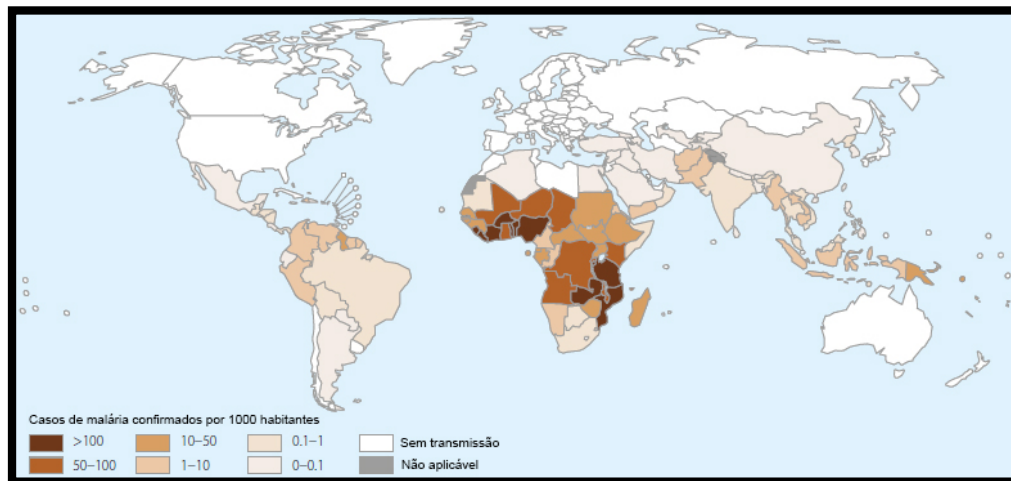


Figura 1. Transmissão da malária em 2013 (adaptada e modificada de WHO 2013: Relatórios dos Programas nacionais de controlo da malária).

1.2.2 O vetor transmissor da malária

Existem aproximadamente 3.500 espécies de mosquitos agrupadas em 41 géneros e no género *Anopheles* existem cerca de 430 espécies. Mosquitos *Anopheles* são encontrados em todo o mundo, exceto na Antártica, mas apenas 30-40 espécies transmitem a malária (Enayati & Hemingway, 2010). Os mosquitos *Anopheles* que podem transmitir a malária são encontrados não só nas áreas endémicas da malária, mas também onde a malária foi eliminada. Estas últimas áreas estão constantemente em risco de reintrodução da doença (Hay *et al.*, 2008). A malária humana é transmitida só pelas fêmeas do género *Anopheles*. As larvas dos mosquitos ocorrem numa extensa variedade de *habitats*, mas a maior parte das espécies preferem águas limpas não poluídas. Muitas espécies preferem *habitats* com vegetação. Outras preferem *habitats* que não têm quase nenhuma vegetação (Sinka *et al.*, 2010). Um factor importante do comportamento é o grau com que uma espécie de *Anopheles* prefere alimentar-se de seres humanos (antropofilia) ou animais como o gado (zoofilia). A maior parte dos mosquitos *Anopheles* não são exclusivamente antropofílicos ou zoofílicos. Contudo, vetores primários da malária em África, *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus*, são fortemente antropofílicos, consequentemente, são dois dos mais eficazes vetores do mundo (Enayati & Hemingway, 2010).

Mosquitos fêmeas fazem refeições de sangue para realizar a produção de ovos e as refeições de sangue são a conexão entre os seres humanos e o mosquito hospedeiro no ciclo de vida do parasita. A espécie *funestus* foi descrita como a primeira que foi responsável pela adaptação do *Anopheles* ao homem como forte vetor antrofilico transmissor da malária, fazendo as refeições no período da noite (entre as 22 h e as primeiras horas da manhã) e penetrando no interior das residências, associado ao fator de ser uma das espécies de maior longevidade (Sinka *et al.*, 2010). O desenvolvimento com sucesso do parasita da malária no mosquito, ‘esporogonia’ ou ciclo extrínseco com a duração de 10 a 18 dias (desde o estadio de ‘gametócito’ ao estadio de ‘esporozoíto’) depende de vários fatores. O mais importante é a temperatura ambiente e a humidade (temperaturas mais elevadas aceleram o crescimento do parasita no mosquito). Depois de obter uma refeição completa, a fêmea descansa uns poucos dias enquanto o sangue é digerido e os ovos se desenvolvem. Uma vez que os ovos estão completamente desenvolvidos, a fêmea põe os ovos e retorna à procura do hospedeiro. O ciclo repete-se até à morte da fêmea. Fêmeas podem sobreviver até um mês, mas a maior parte provavelmente não vive mais do que 1-2 semanas. (CDC, 2012).

1.2.3 Ciclo biológico

O ciclo de vida do parasita começa pela inoculação de esporozoítos no tecido subcutâneo e, com menos frequência, directamente na corrente sanguínea do homem, aquando da picada de um mosquito fêmea *Anopheles* infetada. A figura 2 mostra, de forma resumida, o ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* infetantes ao homem.

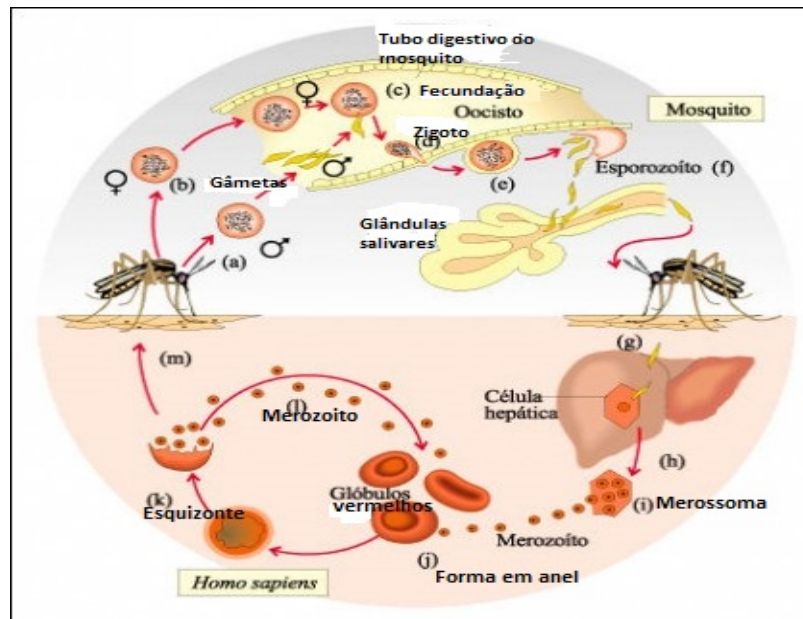


Figura 2. Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* infetantes ao homem (adaptado de Abc da Medicina acessível em <http://www.abcdamedicina.com.br/malaria-ciclo-de-contaminacao-profilaxia-sintomas-e-tratamento.html>).

Os esporozoítos progridem pelo sistema linfático e sanguíneo até ao fígado onde se desenvolvem em esquizontes hepáticos ou formas “exo-eritrocíticas”, através de um processo chamado de esquizogonia, que origina os merozoítos. O co-recetor nos esporozoítos que medeia a invasão envolve, em parte, os domínios da trombospondina na proteína circumesporozoítica (CSP) e na proteína relacionada à adesão à trombospondina (TRAP). Estes domínios ligam-se especificamente aos proteoglicanos sulfato de heparina (HSPG) nos hepatócitos, que se projectam no endotélio sinusoidal, e às células de Kuppfer (Frevert *et al.*, 1993). Nos hepatócitos, cada esporozoíto se converte em dezenas de milhares de merozoítos e cada um pode invadir um eritrócito após a sua libertação na corrente sanguínea. Esta é a única via para a doença, comum a todas as espécies infetantes ao homem (Miller *et al.*, 2002). Nas infeções por *P. vivax* e *P. ovale* alguns merozoítos sofrem esquizogonia, enquanto outros ficam em estado de latência no fígado (hipnozoítos). Estes hipnozoítos são responsáveis pela recorrência da doença após períodos variáveis de incubação (Baird, 2013).

Os merozoítos libertados na corrente sanguínea invadem os eritrócitos do hospedeiro, sofrendo modificações morfológicas até à formação de trofozoítos que evoluem para esquizontes. Os parasitas *P. falciparum* e *P. vivax* desenvolvem-se cada 48 horas nos

eritrócitos produzindo cerca de 20 merozoítos por parasita maduro, sendo cada merozoíto capaz de invadir outros eritrócitos. A sequência da invasão é provavelmente similar para todas as espécies (Miller *et al.*, 2002). O parasita deve se ajustar aos recetores vinculantes obrigatórios no eritrócito e submeter-se a uma reorientação apical, formação de ponte e sinalização (Miller *et al.*, 1979, Haldar & Mohandas, 2009). O passo seguinte é induzir a formação de um vacúolo parasitóforo derivado da membrana plasmática do eritrócito e penetrar no vacúolo. Três organelos no extremo do parasita durante a invasão (apical) caracterizam o filo *Apicomplexa* (micronemas, roptrias e grânulos densos). Os recetores que medeiam a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos e no fígado se encontram nas micronemas, na superfície celular e nas roptrias. A localização destes recetores dentro das organelas pode proteger o parasita da neutralização mediada pelos anticorpos, assim como a libertação de organelos apicais, após o contato com os eritrócitos, pode limitar a exposição aos anticorpos (Miller *et al.*, 2002).

A reprodução assexuada por esquizogonia, os ciclos de invasão eritrocítica e a libertação de inúmeros merozoítos produz uma rápida multiplicação de parasitas que origina os níveis de infecção responsáveis pela doença. Os sintomas da malária são consequência da fase sanguínea do parasita (Vásquez & Tobón, 2012).

Nos eritrócitos alguns parasitas não sofrem esquizogonia, mas transformam-se em gametócitos dimorficamente sexuais (feminino e masculino). Os gametócitos são essenciais para a transmissão da malária, porém não causam sintomas de doença. Estas formas sanguíneas (gametócitos) quando são aspirados por um mosquito fêmea *Anopheles* durante uma refeição de sangue começam outro ciclo diferente de crescimento e multiplicação no mosquito. Neste ponto a estratégia do *P. vivax* difere do *P. falciparum*. O parasita *P. vivax* desenvolve-se em gametócitos muito mais cedo, logo a seguir à libertação de merozoítos no fígado permitindo que a espécie se transmita antes da fase sintomática da doença (Gething *et al.*, 2012).

Os gametócitos chegam ao aparelho digestivo do mosquito e completam o seu desenvolvimento sexual até à forma de gâmetas. As gâmetas fundem-se para formar um zigoto, originando um oocineto móvel, que migra para a parede exterior do estômago do mosquito, onde se forma o oocisto, que sofre várias divisões mitóticas gerando numerosos esporozoítos. Quando o oocisto se rompe, depois de 10-18 dias, liberta os

esporozoítos que atingem as glândulas salivares para completar o ciclo. Quando o mosquito *Anopheles* faz uma refeição de sangue num ser humano, os esporozoítos são injetados com a saliva do mosquito e inicia uma infeção noutra ser humano, onde eles parasitam as células do fígado. Deste modo o mosquito transporta a doença de um ser humano para outro (atuando como um vetor).

1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA MALÁRIA HUMANA

1.3.1 Diagnóstico clínico

O elemento mais importante para o diagnóstico clínico de malária, quer em áreas endémicas ou não endémicas, é um alto índice de suspeição perante um doente febril, uma vez que a distribuição da malária é dispersa mesmo em países onde é prevalente, a informação de residência ou história de viagem pode ser um indicativo de exposição importante. Adicionalmente, a possibilidade de malária accidental (através de transfusão ou agulhas contaminadas) não deve ser subestimada (Hassanpour *et al.*, 2011).

Malária grave pode simular muitas outras doenças que também são frequentes nos países endémicos para a malária. As mais importantes são as infeções do sistema nervoso central, seticemias, pneumonias graves e febre tifóide. Outros diagnósticos diferenciais incluem influenza, dengue e outras infeções por arbovírus, hepatite, leptospirose e febres recorrentes, febres hemorrágicas, infeções por rickettsias, gastroenterites, e tripanosomíase, em África. Em crianças, convulsões devidas a malária devem ser diferenciadas de convulsões febris. Por último, o coma pós-ital geralmente permanece não mais do que meia hora, embora algumas crianças não recuperem completamente a consciência até 60 minutos depois de uma convulsão (WHO, 2012).

1.3.2 Diagnóstico laboratorial

Os diferentes ensaios laboratoriais utilizados no diagnóstico da malária estão classificados em ensaios diretos e indiretos. Os ensaios diretos são os exames parasitológicos, que permitem evidenciar os parasitas ou as hemácias parasitadas. Os ensaios indiretos estão ligados à imunologia (deteção de antígenos plasmodial ou de anticorpos) ou à biologia molecular (sondas genômicas) (Hassanpour *et al.*, 2011).

A microscopia ótica é o método de eleição e a opção mais utilizada para o diagnóstico de malária. A microscopia ótica convencional permite a identificação das espécies de *Plasmodium* presentes na infeção e uma estimativa da densidade parasitária. Em quase todos os casos de infeção o exame da gota espessa e do esfregaço periférico irá revelar parasitas da malária. Estes dois métodos são complementares. A gota espessa é mais sensível do que o esfregaço periférico para detetar baixas parasitémias por malária mas o esfregaço é mais sensível para a identificação isolada de cada espécie (Moody, 2002). Na prática a microscopia convencional depende sobretudo da experiência do técnico, e permite em regra a deteção de 1 a 2% das infeções com mais de uma espécie. Em geral a maior densidade parasitária no sangue periférico representa mais alta probabilidade de doença grave, especialmente nos doentes não imunes (Dondorp, 2008). Contudo, como os parasitas na malária grave por *P. falciparum* estão maioritariamente sequestrados nos capilares e vénulas (e por essa razão não visíveis numa lâmina de sangue periférico) os doentes podem apresentar malária grave com muito baixa parasitémia periférica (Dondorp *et al.*, 2008).

A microscopia por fluorescência envolve a coloração do parasita com corantes, tais como laranja de acridina, com sem o método semi-quantitativo *Buffy y coat*, que utiliza estrato dos eritrócitos centrifugados e comprimidos após coloração com laranja de acridina. Estas técnicas têm melhor sensibilidade que a microscopia convencional mas perde em especificidade (Moody, 2002). Por outro lado, ambas exigem microscópio fluorescente o que limita a sua aplicação mais generalizada (Ochola *et al.*, 2006).

Os testes rápidos de diagnóstico (TRD) estão baseados na deteção de antígenos derivados do parasita, utilizando o método imunocromatográfico. São de fácil execução e de leitura rápida (aproximadamente 15 minutos) e são considerados testes úteis em triagem e confirmação diagnóstica, principalmente em situações de não aplicabilidade da microscopia por exemplo em áreas de difícil acesso (Hassanpour *et al.*, 2011). Atualmente estão disponíveis vários testes comerciais: (1) testes baseados na deteção da proteína II rica em histidina (*Histidine-richprotein I* – HRP2) específico para diagnóstico da infeção por *P. falciparum*; (2) testes baseados na deteção da enzima lactato desidrogenase (*parasite lactate dehydrogenase* – pLDH), que não identificam as espécies do parasita; e (3) testes, mais recentes, que podem combinar a deteção dos antígenos circulantes de *P. falciparum* (HRP2 *antigen*) e o antígeno comum a todas as

outras quatro espécies, a aldolase (*aldolase antigen*) ou ainda, mais recentemente, (4) os antígenos específicos de cada espécie.

Os testes podem ser realizados por pessoal treinado em locais com muito poucos recursos. TRDs para detetar o antígeno PfHRP2 parecem ter maior sensibilidade para o diagnóstico comparativamente aos que detetam pLDH (Hendriksen *et al.*, 2011). Estes testes rápidos para a deteção do antígeno PfHRP2 podem ser úteis para confirmar o diagnóstico de malária por *P. falciparum* em doentes que receberam recentemente tratamento anti-malárico e cuja gota espessa está transitoriamente negativa, mas não devem ser usados para monitorizar a resposta ao tratamento, porque podem permanecer positivos durante 4 semanas depois da negativação da parasitemia (Wilson, 2013). Em doentes com parasitemias muito elevadas os testes PfHRP2 podem ser falsos negativos. Está descrito um efeito chamado de prozona que resulta do excesso quer de antígeno quer de anticorpo dando origem aos falsos negativos (Hendriksen *et al.*, 2011). Mas raramente a gota espessa é negativa num doente que morreu e que na autópsia se encontra intensa sequestração tecidual de *P. falciparum*.

O grupo de trabalho da WHO sobre a avaliação dos testes rápidos disponíveis no mercado para o diagnóstico da malária (Results of WHO Products Testing of Malaria RDTs) Round 3 (2010-2011), recomendou em 2012 que os TRDs devem ser tão precisos quanto os resultados obtidos a partir da microscopia realizada por um técnico com experiência em condições de rotina de campo e ter uma sensibilidade acima de 95% (em relação a microscopia).

A tabela 1 mostra, em resumo, uma comparação entre as diferentes técnicas mais utilizadas para diagnóstico da malária baseada numa revisão sistemática de 48 artigos publicados entre 1980 e 2004 elaborada por Ochola e colaboradores em 2006 com o objetivo de avaliar a sensibilidade das técnicas alternativas na deteção, diagnóstico e controlo da malária nas áreas endémicas, não endémicas (por exemplo: entre os viajantes), e em estudos epidemiológicos de diferentes populações do mundo.

Tabela 1. Técnicas frequentemente disponíveis para detecção dos parasitas da malária no hospedeiro humano, adaptado de (Ochola *et al.*, 2006)

<i>Plasmodium spp</i>		Limites da detecção (parasitas por μL)
Coloração: Giemsa	Presença de <i>Plasmodium spp</i> (gota espessa)	5–20
	Todos <i>Plasmodium spp</i> (esfregaço)	50–200
Acridine laranja	Presença de <i>Plasmodium spp</i>	100
Quantitative buffy coat	Presença de <i>Plasmodium spp</i>	100
Rhodamine 123	Presença de <i>Plasmodium spp</i>	Sem dados
pLDH (OptiMAL, DiaMed)	Específica para <i>P. falciparum</i> e não- <i>falciparum</i> , principalmente <i>P. vivax</i>	100
HRP2 (10 dipsticks incluindo ICT malária Pf test, ParaSight F, KAT-Quick Malaria test)	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> ou mista não- <i>falciparum spp</i>	100

O advento da biologia molecular trouxe algumas descobertas com implicações no diagnóstico, terapêutica e *follow up* de doentes das mais diversas especialidades médicas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é hoje o método mais sensível e mais específico para detetar os parasitas da malária, e tem valor acrescido na investigação. Contudo o tempo que medeia entre a colheita da amostra, transporte e processamento e o retorno do resultado ao médico assistente limita a utilidade do teste na prática diária (Hänscheid & Grobusch, 2002). Por outro lado, na maioria das áreas onde a infeção se transmite, fatores como recursos financeiros limitados, parasitemia subclínica persistente e inadequados meios de laboratório nas áreas rurais mais pobres e remotas

excluem a PCR como método diagnóstico onde a microscopia óptica continua a ser o procedimento de referência, sobretudo em África, mantendo-se a expectativa no baixo custo e aperfeiçoamento dos testes rápidos de diagnóstico (TRD). Adicionalmente a detecção do parasita com baixa parasitêmia pode não ser clinicamente relevante porque a simples positividade na amostra de sangue não implica necessidade de tratamento individual, tendo em conta a importância da parasitêmia subclínica para o desenvolvimento da imunidade parcial (Wilson, 2013). Mesmo nos países não endêmicos a PCR não é um método para uso rotineiro. Contudo, a PCR pode ser útil quando utilizada em estudos epidemiológicos, porque as técnicas da PCR permitem a identificação das variações do parasita da malária e a detecção de subpopulações parasitárias mistas, sobretudo quando existentes em níveis muito baixos (Ashley & White, 2014).

As técnicas de PCR tipicamente têm sido aplicadas nas amostras de sangue por punção digital ou nas manchas de sangue no papel de filtro, num volume de cerca de 5µL apenas. Isto obviamente interfere com a detecção de densidades inferiores a 1 parasita em 5µL ou 200 parasitas por mL. Utilizando volumes pouco maiores de sangue podem detetar-se densidades de parasitas até aproximadamente 20 parasitas por mL, uma magnitude muito superior à da microscopia ótica (Ashley & White, 2014). Têm ainda a vantagem de contribuir para a identificação de marcadores de resistência a fármacos, diferenciar as recrudescências das reinfeções e pesquisa de mutações, polimorfismos e análise de microssatélites.

1.4 PATOGÉNESE DA MALÁRIA GRAVE

As teorias actuais sobre a patogénese da malária grave incluem: (1) o papel da resposta inflamatória excessiva e desregulada à infeção; (2) a ativação endotelial incluindo a suprarregulação das moléculas de adesão endotelial, a libertação de fatores angiogénicos e a disrupção da integridade endotelial; e (3) a activação da cascata da coagulação e outros processos que contribuem para o bloqueio mecânico e sequestração dos eritrócitos parasitados no endotélio microvascular. Juntos, estes mecanismos podem resultar na lesão vascular específica e com consequências orgânicas características da malária grave (Vásquez & Tobón, 2012).

No sistema nervoso central, estes mecanismos levam à alteração do fluxo sanguíneo vascular e tecidual, aumentando a permeabilidade vascular, promovendo a disfunção da barreira hemato-encefálica e as lesões neuronais, e contribuem para as características clínicas da malária cerebral, incluindo coma e depressão neurológica (Storm & Craig, 2014). Na malária placentária, este processo pode manifestar-se como lesão física do sinciciotrofoblasto e reorganização da irrigação da placenta e em função disso contribui para gravidez de risco e parto prematuro, bem como atraso do crescimento fetal (Fried & Duffy, 1996). Finalmente, a infecção por *P. falciparum* pode contribuir para a malária com anemia severa acentuando a destruição mediada pelo hospedeiro de eritrócitos infetados e não infetados (Kai & Roberts, 2008).

A gravidade da malária depende da relação entre hospedeiro (vulnerabilidade e estado imunológico) e a espécie de *Plasmodium spp* (espécie infetante e densidade parasitária) (Miller *et al.*, 2002). Quanto ao hospedeiro, os que se encontram mais vulneráveis às formas graves da doença são as primoinfeções, as gestantes e as crianças pequenas. A periodicidade da esquizogonia sanguínea é variável, de acordo com a espécie (36 a 48 horas no caso de *P. falciparum*). Devido à menor duração do seu ciclo tecidual, à maior produção de merozoítos durante as esquizogonias tecidual e eritrocitária e a capacidade de infetar eritrócitos de qualquer idade, o *P. falciparum* tem a potencialidade de produzir hiperparasitemias, intimamente relacionada com a gravidade da infecção (Marchiafava, 1884). Além disso, o *P. falciparum* parece ser a única espécie que produz alterações na microcirculação, concorrendo assim para o surgimento de uma doença mais grave (MacPherson *et al.*, 1985). Após a invasão dos eritrócitos pelo protozoário acontecem, progressivamente, mudanças na membrana celular, com alteração das propriedades de transporte, exposição de antígenos de superfície e inserção de proteínas derivadas do microrganismo. Os eritrócitos infetados pelo *P. falciparum* apresentam protruções eletrodensas em sua superfície (do inglês *knobs*), o que facilita a aderência dessas protusões às células endoteliais de vênulas pós-capilares e capilares de diversos órgãos, como cérebro, pulmões e rins, além da presença de adesinas do parasita, propiciando maior gravidade da doença, através do fenómeno conhecido por citoaderência (Miller *et al.*, 2002).

Somando-se à citoaderência, existe também o processo de produção de “rosetas”, no qual as células infetadas aderem a células não-infetadas, havendo, portanto, o efeito

sinérgico dos dois fenómenos na patogénese da malária grave, com formação de agregados celulares que interferem na microcirculação (Ho *et al.*, 1991). Para além disso, na malária grave, os eritrócitos infetados e os não-infetados tornam-se rígidos, o que promove uma obstrução adicional ao fluxo sanguíneo (Dondorp *et al.*, 2008). A propriedade de citoaderência explica a razão pela qual só os trofozoítos jovens, e não formas maduras de *P. falciparum*, são observadas no sangue periférico, já que estas são sequestradas na microcirculação.

O verdadeiro significado do fenómeno de formação de rosetas não está ainda clarificado, não existindo dados que comprovem o seu papel direto na gravidade do quadro clínico. Carlson e colaboradores (1990) confirmaram a formação de rosetas em crianças da Gâmbia com malária cerebral contrariamente ao grupo de crianças com malária não complicada, sugerindo que este fenómeno tem implicação na patogénese da forma cerebral da doença (Carlson *et al.*, 1990). Por outro lado, al-Yaman e colaboradores (1995) não comprovaram a relação da formação de rosetas com o *outcome* em crianças com malária cerebral na Papua Nova Guiné (al-Yaman *et al.*, 1995).

O ciclo de vida do parasita da malária é complexo. A invasão dos eritrócitos por merozóitos do *Plasmodium spp* é um processo de múltiplas etapas e de interações de proteínas específicas entre o parasita e os eritrócitos. A primeira etapa é o reconhecimento inicial e a adesão reversível do merozóito ao eritrócito seguido pela sua reorientação apical, formação da junção irreversível com a terminação apical do merozóito e finalmente a entrada no eritrócito num vacúolo parasitóforo (Miller *et al.*, 1979). Este estágio do ciclo da vida é visto como um alvo atrativo para o desenvolvimento de intervenção para o combate à malária porque a invasão do eritrócito pelo merozóito requer expressão de proteínas especializadas tais como a proteína 1 da superfície dos merozóitos (MSP-1) e uma série de interações moleculares altamente específicas (Mackintosh *et al.*, 2004).

Foram reconhecidas diversas moléculas *in vitro* como recetores que medeiam a aderência dos eritrócitos. Os recetores mais importantes são a glicoproteína CD36, a molécula 1 de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1) no endotélio e o sulfato A de condroitina (*Chondroitin Sulfate A*, CSA) na placenta. Outros recetores incluem a molécula 1 de adesão vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*,

VCAM-1), a E-selectina no endotélio, as proteínas PCAM-1/CD31 nas plaquetas e endotélio, o sistema de antígenos ABO, o sulfato de heparina e o recetor 1 do complemento (CR1) nos eritrócitos não parasitados (Ringwald *et al.*, 1993). Sob condições fisiológicas, o sequestro pode obedecer a uma interação com múltiplos recetores e em parasitas isolados se observaram fenótipos multiadesivos que se associam com doença grave (Vásquez & Tobón, 2012).

A tabela 2 mostra em resumo os fenómenos associados às diferentes moléculas que foram identificadas como recetores no homem e as células onde são expressos.

Tabela 2. Células e recetores melhor reconhecidos do hospedeiro, envolvidos na interação com os eritrócitos parasitados por *P. falciparum* (adaptado de Vásquez & Alberto Tobón, 2012).

Células do hospedeiro	Fenómeno	Recetores
Células endoteliais dos capilares	Sequestro nos capilares	CD36, ICAM-1, VCAM-1 E-selectina
Espaço entre as vilosidades da placenta e sincitiotrofoblasto	Sequestro placentário	CSA, HÁ
Eritrócitos não parasitados	Rosetas	CR1, HS, grupos Sanguíneos A e B
Eritrócitos parasitados	Autoaglutinação	Desconhecido
Plaquetas agregadas		CD36, PCAM-1
Monócitos e células dendríticas	Modulação da resposta imunitária	CD36

A molécula de adesão CD36 (*Cluster of Differentiation 36*) é o recetor identificado com maior frequência; participa no sequestro em diferentes órgãos como pulmão, rim, fígado, intestino e músculo; expressa-se no endotélio, monócitos/macrófagos, plaquetas e células dendríticas. A união a este recetor é comum nas culturas de eritrócitos parasitados isolados em diferentes países de África, por exemplo na Tailândia (Riganti *et al.*, 1990) e Brasil (Kirchgatter & Portillo, 2002). A relação entre o CD36 e a gravidade clínica é controversa; em geral, associa-se este recetor com doença não complicada (Mackintosh *et al.*, 2004).

Ao contrário, a molécula de adesão ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) associa-se com doença grave, em particular com malária cerebral. A molécula ICAM-1 participa na aderência do glóbulo vermelho parasitado ao endotélio do cérebro, fígado, rim e pulmão. A união a ICAM-1 observou-se em 80 % dos eritrócitos parasitados por

P. falciparum em culturas obtidas de crianças com doença grave em África e é comumente encontrado na Tailândia (Riganti *et al.*, 1990) e Brasil (Kirchgatter & Portillo, 2002). Os estímulos inflamatórios como o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), cujos níveis estão aumentados na malária, induzem a expressão deste recetor. A aderência dos eritrócitos parasitados ao endotélio cerebral induz diretamente a expressão de ICAM-1 por ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB). A ICAM-1 e o CD36 cooperam sinergicamente, aumentando a adesão dos glóbulos vermelhos parasitados ao endotélio que expressa ambos os recetores.

A PCAM-1, a VCAM-1, a E-selectina e P-selectina representam fenótipos aderentes menos frequentes em isolamentos de *P. falciparum*. A união a PCAM-1 foi encontrada em 50 % dos eritrócitos parasitados isolados em culturas e colhidos em crianças com malária por *P. falciparum* no Quênia (Heddini *et al.*, 2001). Esta molécula expressa-se nas células endoteliais, leucócitos e plaquetas, o que sugere a sua participação em diferentes fenómenos adesivos de *P. falciparum*. A união a VCAM-1, E-selectina e P-selectina foi descrita originalmente em cepas de parasitas cultivadas *in vitro*; não é frequente nos isolamentos de doentes (Vásquez & Tobón, 2012).

A proteína 1 da membrana dos eritrócitos parasitados por *P. falciparum* conhecida como PfEMP1 é frequentemente identificada na infeção por esta espécie, e pensa-se que tem um papel crucial na patogénese da doença porque medeia a adesão às células do hospedeiro e a resposta imunitária (Kyriacou *et al.*, 2006). Ela adere a todos os recetores identificados; é uma proteína polimorfa de alto peso molecular (200-350 kDa), com taxas de variação antigénica clonal *in vitro* de 2 % por ciclo de vida. Esta proteína é codificada pela família multigénica *var*, localizada preferencialmente nos subtelómeros dos cromossomas, onde se favorece a recombinação para gerar diversidade. Cada genoma de *P. falciparum* possui entre 40 a 60 genes *var*, com sequências muito divergentes numa mesma estirpe e entre diferentes cepas de *P. falciparum*. Os genes *var* expressam-se de forma mutuamente exclusiva, gerando uma só variante de PfEMP1 por ciclo celular; todo o repertório de genes se transcreve no estágio de anel, porém só um traduz a proteína que determina o fenotipo aderente e antigénico de eritrócito parasitado. A família *var* classifica-se em quatro grupos segundo a sequência de sua região promotora 5' (Ups), localização no cromossoma e direção para a qual são transcritos. Os genes B e C são os mais abundantes no genoma

de *P. falciparum* e codificam para 80 % das *PfEMP1*, as quais se unem na sua maioria a CD36 e só apenas algumas a ICAM-1 (Vásquez & Tobón, 2012).

A expressão de genes *var* específicos em diferentes apresentações clínicas da doença, sugere que um subgrupo de genes está associado com malária sintomática e complicações. Os estudos serológicos sustentam esta hipótese; a doença grave causada por *P. falciparum* em crianças não imunes tende a expressar subtipos específicos de antígenos de superfície. Estes antígenos se expressam com menor frequência em crianças com certo grau de imunidade (Bull *et al.*, 2000). Observou-se um aumento significativo na expressão de transcritos do grupo B em crianças com malária sintomática (moderada e grave) na Papua Nova Guiné (Falk *et al.*, 2009), Tanzânia (Rottmann *et al.*, 2006) e Mali (Kyriacoua *et al.*, 2006); enquanto os transcritos de genes C se expressam de forma predominante em casos de malária assintomática e hiperparasitemias não associadas com o desenvolvimento de manifestações graves.

Sugere-se a participação de proteínas codificadas por genes de tipo A no desenvolvimento de malária complicada; domínios DBL-1 do grupo A foram associados com doença grave e falência multiorgânica em doentes do Brasil (Kirchgatter & Portillo, 2002). Também observou-se aumento de transcritos *var* A em casos sintomáticos e doença grave em comparação com casos assintomáticos e doença moderada, na Tanzânia (Rottmann *et al.*, 2006) e na Papua Nova Guiné (Falk *et al.*, 2009) e Mali (Kyriacoua *et al.*, 2006). Adicionalmente, a transcrição de genes *var* de tipo A parece que se relaciona com maior frequência com formação de rosetas embora noutros estudos na Papua Nova Guiné (al-Yaman *et al.*, 1995) não se encontrou relação entre doença grave e expressão de genes *var* A, nem com a formação de rosetas.

Em doentes com malária há aumento na expressão de moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina na superfície endotelial, nos tecidos e no plasma. Ambos E-selectina e VCAM-1 actuam como recetores *in vitro* mas não parecem ter um papel *in vivo* (Craig & Scherf, 2001). Nos doentes com malária complicada, observou-se que nas células endoteliais com ativação inflamatória ou na apoptose, se formam micropartículas que têm propriedades proinflamatórias e procoagulantes que podem ampliar a cascata inflamatória (Vásquez & Tobón, 2012).

A citoaderência entre glóbulos vermelhos parasitados e células endoteliais *in vitro* promove um aumento na expressão de ICAM-1, a produção de IL-6 e quimiocinas

como CCL20/ MIP3 α (proteína inflamatória 3 α do macrófago), CXCL8 y CCL2/MIP1 (proteína 1 quimioatraente de monócitos), importantes moléculas que atraem leucócitos aos tecidos inflamados (Vásquez & Tobón, 2012). A interação dos glóbulos vermelhos parasitados com o endotélio cerebral e pulmonar culmina na ativação do fator de transcrição NF-Kb, o qual aumenta a expressão de ICAM-1 e moléculas proinflamatórias (Perkins *et al.*, 2011).

A interação entre os parasitas isolados dos doentes com malária e o endotélio reduz a expressão das moléculas de adesão intercelular, como ocludina, vinculina e ZO1, o que compromete a integridade da barreira endotelial no sistema capilar (Susomboon *et al.*, 2006). As células do endotélio pulmonar aumentam a expressão dos genes proinflamatórios e proapoptóticos, e experimentam morte celular mediada por caspases em resposta ao contato com os eritrócitos parasitados *in vitro*. Os eritrócitos com polimorfismos em CR1, frequentes na população africana, apresentam redução na formação de rosetas e os doentes com estes polimorfismos estão protegidos contra a doença grave o que sugere a importância deste recetor na patogenia. Também se descreveu que os glóbulos vermelhos parasitados podem formar agregados entre eles e as plaquetas através da união a CD36 expressado nestas; este fenótipo de aderência se relacionou fortemente com a malária grave. Outro recetor invocado neste fenómeno é a molécula C1Qr/HABP1/p32, que também é expressa no endotélio e é mediadora de adesão nestas células (Kai & Roberts, 2008).

1.5 APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA GRAVE

A malária grave é geralmente causada por infecção pelo *P. falciparum*, embora o *P. vivax* e o *P. knowlesi* podem também ocasionalmente causar doença grave (Baird, 2013). Praticamente todas as mortes por malária resultam de infecção por *P. falciparum*. O risco é maior quando se atrasa o tratamento de um episódio não complicado de malária causado por estes parasitas. O reconhecimento e o tratamento imediato da malária não complicada são assim de importância vital. Contudo por vezes, e especialmente em crianças, a malária por *P. falciparum* pode desenvolver-se tão rapidamente que o tratamento precoce da malária não complicada não é viável.

Têm sido publicadas definições estritas de malária grave para fins epidemiológicos e de pesquisa, mas na prática, deve existir um baixo limiar para a decisão de início do tratamento parentérico. Mesmo que alguns dos testes laboratoriais não estejam disponíveis imediatamente, isto não deve atrasar o início do tratamento intensivo.

Uma revisão geral dos aspetos da malária grave é mostrada nos quadros abaixo. As manifestações podem ocorrer isoladamente, ou mais frequentemente em combinação no mesmo doente.

- Alteração da consciência (incluindo coma não respondível)
- Prostração, por exemplo fraqueza generalizada (doente incapaz de se sentar, levantar e ou caminhar sem ajuda)
- Convulsões múltiplas, mais do que dois episódios em 24 horas
- Respiração profunda e ‘*distress*’ respiratório (respiração acidótica)
- Edema pulmonar agudo ou síndrome de *distress* respiratório agudo
- Colapso circulatório ou *shock*, pressão sanguínea sistólica <80 mmHg no adulto ou <50 mmHg na criança
- Insuficiência renal aguda
- Icterícia mais evidência de disfunção de órgão ou hemorragias anormais

Achados laboratoriais e outros:

- Hipoglicemia <2,2 mol/l ou <40mg/dl
- Acidose metabólica (bicarbonato <a 15 mmol/l)
- Anemia normocítica grave (hemoglobina <5g/dl e hematócrito <15% em crianças; <7g/dl e <20% em adultos);
- Hemoglobinúria
- Hiperlatacémia (latatos> 5 mmol/l)
- Disfunção renal (creatinina> 2,8 mg/dl)
- Edema pulmonar (padrão radiológico)

Critérios de classificação da malária grave adaptados de “WHO Severe Malaria 2012”

Alta parasitemia parece ser um dos fatores de risco para a morte por malária *P. falciparum*, mas a relação entre parasitemia e prognóstico varia de acordo com o nível de transmissão da doença (Trampuz *et al.*, 2003). Macdonald (1967) preferiu a

classificação de endemicidade estável e instável que deriva de um conhecimento mais profundo da matemática dos determinantes entomológicos da transmissão da malária, adaptada pelo grupo de trabalho técnico sobre a estratégia do controlo e eliminação global da malária da WHO.

Malária endémica estável: ocorre em regiões onde a população está exposta de forma contínua a uma taxa constante de inoculação de parasitas por mosquitos infetados. Está naturalmente relacionada com as condições climáticas (nomeadamente com o calor e o grau de humidade com poucas flutuações ao longo do ano), mas também com caraterísticas biológicas dos vectores.

Malária endémica instável: a população está sujeita a grandes flutuações na inoculação dos parasitas. A transmissão geralmente é focal e sazonal.

Malária epidémica: é uma forma extrema de transmissão instável. Ocorre quando uma população não imune fica sujeita à transmissão da malária acima do que acontece normalmente na região.

Classificação das áreas de endemicidade da malária adaptado de “WHO Severe Malaria 2012”.

A WHO no documento sobre Severe Malaria publicado em 2012 afirma que em áreas de baixa transmissão, a mortalidade começa a aumentar com densidades parasitárias acima de 100.000 parasitas por μL de sangue (aproximadamente 2,5% de parasitémia), ao contrário, em áreas de alta transmissão estas parasitémias podem ser bem toleradas. Por outro lado, as parasitémias superiores a 20% estão associadas com um alto risco em qualquer contexto epidemiológico (WHO, 2012).

O risco para malária grave nas áreas de endemicidade estável é maior entre crianças e visitantes (de qualquer idade) provenientes de áreas não endémicas. Nas outras áreas a malária grave é mais uniformemente distribuída em todas as idades. O risco está aumentado no segundo e terceiro trimestre da gravidez, em doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida (Sida) com doseamento de células TCD4^+ inferior a 200 células por μL e em pessoas que foram esplenetomizadas (Cohen *et al.*, 2005).

Atualmente o Programa Global de Erradicação da Malária (do inglês *Global Malaria Eradication Programme*), definiu pontos de acção para os programas incorporando medições da endemicidade que foram institucionalizadas. As medidas da taxa de parasitas e a incidência parasitária anual por 1.000 habitantes (API) têm papéis cruciais

no programa e juntas ajudam a definir as transições entre as quatro fases da erradicação: preparatória, ataque, consolidação e manutenção. Este programa internacional tem ajudado os países a reavaliar as prespetivas para a erradicação da malária (Hay *et al.*, 2008).

A **malária cerebral** (MC) é uma das complicações mais registadas na malária grave. É definida clinicamente pela presença de parasitémia por *P. falciparum* e coma sem resposta, excluídas todas as outras causas de coma, tais como meningite. O coma é avaliado pelas respostas verbal e motora segundo a escala pediátrica de Blantyre (1 ou 2 numa pontuação até 5) (Molyneux *et al.*, 1989) ou escala de Glasgow (com pontuação de menos de 11 numa pontuação até 15) para os adultos (Teasdale & Jennett, 1974). As convulsões são comuns, tanto nos adultos como nas crianças. Nos adultos, as hemorragias da retina estão associadas com mau prognóstico. Podem ser observadas anomalias dos movimentos oculares, especialmente o olhar divergente. Há hipertonía do pescoço sem a clássica rigidez da nuca. O coma grave pode culminar com sinais de descerebração ou de descorticação, sendo o opistótono mais comum nas crianças. A mortalidade é de 15 a 20%, mas 10 a 20% dos sobreviventes sofrem de sequelas neurológicas que podem perdurar longo tempo (Birbeck *et al.*, 2010). O diagnóstico definitivo faz-se após a morte pela deteção de hemorragias cerebrais e lesões isquémicas com a presença de sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral.

Apesar de várias décadas de pesquisa sobre a MC há ainda pouco conhecimento sobre o que causa a malária cerebral e a razão por que algumas pessoas a desenvolvem. Alta parasitémia não é um pré-requisito da MC (Gravenor *et al.*, 1998) e tem sido difícil atribuir características específicas do parasita para a doença.

Embora a sequestração dos eritrócitos infetados por *P. falciparum* tenha sido o mecanismo frequentemente implicado na patogenia, ainda não está esclarecido se o efeito é diretamente e exclusivamente responsável por esta complicação clínica. Discute-se sobre os papéis relativos da inflamação e da citoaderência, mas provavelmente ambos os fatores têm uma influência variada na apresentação clínica. Alguns estudos documentam que (1) a sequestração e congestão correlacionam-se com a gravidade da doença (2) a produção de latato por glicólise anaeróbica, secundária à obstrução vascular, correlaciona-se também com a gravidade da doença (3) alterações da citoaderência devidas à distribuição anormal ou redução da expressão de PfEMP1

nos eritrócitos nas hemopatias causam proteção contra a doença grave. (Fairhurst *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013) (4) terapêutica adjuvante com base nas causas alternativas da MC, tais como ativação das citocinas ou hipovolêmia, não têm provado ser eficazes. Mas, em contrapartida, embora *P. vivax* não produza sequestro na microcirculação, causa ativação endotelial (Yeo *et al.*, 2010) e encefalopatia e coma nas crianças (Manning *et al.*, 2012). Finalmente, o papel pró-inflamatório da TNF não está clarificado na associação com MC, sendo a principal citocina envolvida nesta complicação (Storm & Craig, 2014).

A **anemia grave** também é uma manifestação frequente e precoce da malária, a qual ocorre devido a múltiplos fatores, incluindo destruição ou sequestro dos eritrócitos parasitados e não parasitados, ineficácia ou redução da eritropoiese, deseritropoiese e supressão da medula óssea (Perkins *et al.*, 2011). A anemia da malária grave é definida como hematócrito menor que 15% ou concentração de hemoglobina inferior a 5 g/dl. Contudo, em áreas com condições de transmissão diferentes das africanas, essa definição é pouco apropriada, sendo a anemia da malária definida como a redução da hemoglobina ou do hematócrito abaixo dos níveis esperados por idade, sexo e condição na presença do *Plasmodium spp* (Gomes *et al.*, 2011). Recentemente, polimorfismos na expressão de citocinas têm sido associados à suscetibilidade de ocorrência da anemia grave (Chasis & Mohandas, 2008), destacando-se: (1º) a IL-6 induz a expressão da hepcidina, que é a principal reguladora da homeostasia sistêmica do ferro, levando a diminuição do ferro disponível para a eritropoiese; (2º) o fator de transformação do crescimento (TGF) inibe a proliferação dos eritroblastos; (3º) o TNF- α leva a maior clivagem do fator de transcrição eritroide; (4º) o INF- γ induz a produção pelos macrófagos de ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF- α o qual inibe a diferenciação dos eritroblastos. Vários estudos demonstraram que infecções virais (p. ex., vírus da imunodeficiência humana), bacterianas e parasitárias (helmintas) estão associadas a maior probabilidade de desenvolvimento e gravidade da anemia na infecção pelo *P. falciparum*, além de alterações genéticas (hemoglobinopatias) e deficiências nutricionais (Perkins *et al.*, 2011).

A **insuficiência renal** é outra das complicações frequentes, particularmente nos adultos (Koh *et al.*, 2004). Nas infecções causadas pelo *P. falciparum* as alterações tubulares são

mais proeminentes do que as glomerulares, podendo variar desde um atingimento de pequena monta até necrose tubular aguda e insuficiência renal aguda (IRA), frequentemente oligúrica e hipercatabólica. Considera-se o diagnóstico da IRA nas situações em que há oligúria (diurese inferior a 400 ml/24 horas) e elevação sérica de creatinina e ureia. O efeito das hemácias infetadas na microcirculação é o principal fator fisiopatogênico da IRA, além dos eventos hemodinâmicos, imunológicos, elevação sérica de creatinina e ureia e alterações metabólicas. O fenómeno da citoaderência e os eventos embólicos na microcirculação, além da diminuição da deformabilidade das hemácias culminam na redução do fluxo sanguíneo sistémico e consequente isquemia renal. O componente hemodinâmico responsável pelo acometimento renal não está limitado aos eventos microembólicos; envolve também a ativação endotelial mediada pela maciça liberação de citoquinas vasoativas, hipovolemia e a redução da viscosidade sanguínea, tal como observado em quadros de sepses. A insuficiência renal na malária está associada à presença de níveis séricos elevados de TNF- α (Day *et al.*, 1999). Os mediadores inflamatórios libertados pela resposta imunológica induzem a vasoconstrição e a libertação de catecolaminas, as quais aumentam ainda mais o efeito vasoconstritor. A consequente lesão renal decorrente dessas alterações está ligada à toxicidade direta das catecolaminas sobre o parênquima renal, assim como às implicações hemodinâmicas que culminam em isquemia. Outros mecanismos como a deposição de imunocomplexos e a glomerulopatia imunomediada também contribuem para a lesão renal (Brown, 1969).

O **edema pulmonar** na malária ocorre com uma incidência de 3% a 10% nas infeções causadas por *P. falciparum*, com letalidade próxima dos 70% (Taylor *et al.*, 2006). O primeiro sinal de disfunção pulmonar é o aumento da frequência respiratória, o qual habitualmente precede as alterações radiográficas. A apresentação mais grave é a síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA), a qual se caracteriza por lesão endotelial difusa e aumento da permeabilidade capilar, manifestando-se em poucos dias no curso da doença (Taylor *et al.*, 2006). O edema pulmonar pode ocorrer após o início do tratamento, em alguns casos associado ao aporte excessivo de líquidos, sendo necessário avaliar criteriosamente a terapia de reposição hídrica nestes doentes. A lesão endotelial produzindo aumento da permeabilidade alveolar, possui, muito provavelmente, papel central na injúria pulmonar, tendo em vista a aderência de

hemácias infetadas, liberação de citocinas e adesão leucocitária (Vásquez & Tobón, 2012). Em estudo *post-mortem* realizado em indivíduos que morreram de malária por *P. falciparum*, com diagnóstico de insuficiência respiratória, foi detetado edema citoplasmático de células endoteliais, edema intersticial pulmonar com hemácias parasitadas aderidas ao interior dos capilares. A julgar pelas alterações pulmonares potencialmente fatais no indivíduo com malária grave, com possível evolução para a insuficiência respiratória aguda, a assistência ventilatória mecânica deve ser ponderada dentro do contexto clínico no qual o doente se encontra, considerando os riscos que esta terapêutica irá proporcionar como pneumonia nosocomial, pneumotórax e aumento do tempo de internamento em unidade de terapia intensiva (UCI) (Sarkar *et al.*, 2010).

O **colapso circulatório**, caracterizado como pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg na posição supina em indivíduos com idade acima de cinco anos, pode se desenvolver rapidamente, estando geralmente associado com outras complicações da doença (Gomes *et al.*, 2011). Na maioria dos casos, o choque se caracteriza pela resistência vascular periférica reduzida e função cardíaca preservada (choque hiperdinâmico) (Hanson *et al.*, 2014). A presença de choque em doentes com infecção pelo *Plasmodium spp* é definida como ‘síndrome da malária álgida’, a qual pode estar associada à insuficiência adrenal aguda, falência miocárdica, edema pulmonar agudo e sangramentos profusos causados por coagulação intravascular disseminada ou rotura de hematoma subcapsular esplênico (Gomes *et al.*, 2011). Trata-se de uma complicação de rara ocorrência desencadeada por inúmeros mecanismos incluindo infecção bacteriana concomitante, desidratação e deficiência de glucocorticoides decorrente da insuficiência suprarrenal aguda. A associação da malária álgida com septicémias por bactérias Gram-negativas tem sido frequentemente relatada, principalmente nas crianças (Berkley *et al.*, 1999). É mandatória a associação precoce com antibióticos de amplo espectro para o tratamento desta complicação.

A infecção pelo *P. falciparum* está geralmente associada com um **estado procoagulante** caracterizado por trombocitopenia e ativação da cascata de coagulação e do sistema fibrinolítico. No entanto, a ocorrência de eventos hemorrágicos clinicamente significantes, por exemplo, hematemeses e/ou melenas é incomum (ocorre em menos de 10% dos doentes, parecendo incidir com maior frequência nos não imunes). Os

eventos hemorrágicos mais registados, quando presentes, traduzem-se por hemorragias das gengivas, epístaxes, petéquias e hemorragia subconjuntival e não têm relação com a trombocitopenia (Gomes *et al.*, 2011).

A ocorrência de **hipoglicemia** é comum em doentes com malária grave, podendo levar a convulsões e coma (Jakobsen *et al.*, 1995). A fisiopatologia da hipoglicemia em adultos está usualmente associada à hiperinsulinemia, a qual pode ser resultante da estimulação de células pancreáticas por fatores derivados do *Plasmodium* (Planche & Krishna, 2006). É de difícil deteção, pois suas manifestações se assemelham com outras alterações presentes na malária grave, tais como ansiedade, dispneia, taquicardia, sudorese, coma e convulsões generalizadas. Em alguns doentes, a deterioração do estado de consciência pode ser o único sinal.

A **acidose metabólica** está relacionada ao aumento do metabolismo anaeróbico da glicose, o que, na malária grave, pode decorrer da isquemia tecidual associada à anemia (diminuição da capacidade de transportar oxigénio), elevação da atividade muscular durante as convulsões, aumento da demanda nutricional pelos eritrócitos parasitados, inibição da oxidação da glicose nos eritrócitos parasitados causada pela deficiência de tiamina, febre e o consequente aumento das citoquinas, além da diminuição da depuração do latato pelo fígado devido à redução do fluxo sanguíneo hepático. Assim, a combinação destes fatores leva à mudança do metabolismo aeróbio, predominantemente nas condições fisiológicas, para o anaeróbio originando um aumento do latato (Day *et al.*, 2000). A hipovolemia outrora era considerada como mecanismo adjuvante na fisiopatologia da acidose metabólica na malária grave, mas hoje considera-se sem dúvida uma forma de simplificação, porque em muitos casos não existe hiperlatacemia associada (Mackintosh *et al.*, 2004).

Na tentativa de compensação da **acidose metabólica**, em geral, pode-se observar a resposta respiratória de hiperventilação manifestada clinicamente pela respiração de Kussmaul, a fim de produzir alcalose respiratória. Doentes muito graves estão geralmente acidóticos, com baixas concentrações de bicarbonato e baixo pH (Day *et al.*, 2000). Podem ocorrer outros distúrbios eletrolíticos (sódio, potássio cloro e fosfato), sendo a hipercaliémia a mais frequentemente registada (Maitland *et al.*, 2005).

O **envolvimento hepático** na malária grave é um evento comum, manifestando-se, principalmente, por icterícia (à custa de bilirrubina direta), hepatomegalia e discreta elevação do nível sérico das aminotransferases (Das *et al.*, 2007). Os níveis de enzimas hepáticos estão, em geral, muito mais baixos do que na hepatite viral aguda (Mishra *et al.*, 2003). Trata-se de uma entidade com características histopatológicas distintas, podendo, em alguns casos, induzir a alterações na função do órgão – redução na síntese dos fatores de coagulação, dificuldade no metabolismo de alguns anti maláricos e alterações na gliconeogénese contribuindo para a ocorrência da hipoglicemia e acidose láctica – chegando, eventualmente, à insuficiência hepática aguda. Os achados patológicos mais frequentes consistem em proliferação de células reticuloendoteliais, congestão, infiltração periportal, infiltração e dilatação sinusoidal e colestase (Kochar *et al.*, 2003).

Os doentes com deficiência de glicose -6-fosfato desidrogenase e outras deficiências de enzimas eritrocitárias podem desenvolver hemólise intravascular, com aparecimento de hemoglobinúria, quando são tratados com drogas oxidantes, como por exemplo, a primaquina, quinino e sulfas. Mas atualmente a ‘**febre hemoglobinúrica**’ é rara (Bruneel *et al.*, 2001). No passado ocorria principalmente nos doentes caucasianos não imunes, que vivendo nas áreas de transmissão da malária, tomavam irregularmente quinina para profilaxia ou tratamento presuntivo de episódios de doença.

1.6 RESPOSTA IMUNE CELULAR NA MALÁRIA GRAVE

A aquisição e manutenção da imunidade protetora contra a malária depende principalmente dos linfócitos T. Estas células desempenham uma função indispensável na cooperação para a produção de anticorpos e o estabelecimento de uma resposta imuno celular contra o *Plasmodium spp*. A infecção pelo *Plasmodium spp* é capaz de estimular os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, células NK (*natural killer*) e macrófagos. É necessária a participação dos linfócitos T CD4⁺ no estabelecimento da imunidade protetora contra a fase eritrocítica assexuada do parasita. Os linfócitos T CD8⁺ são importantes na fase hepática da infecção. Os macrófagos e as células NK desempenham um papel central no início da infecção (Legorreta-Herrera & Sánchez-Cruz, 1999).

Os macrófagos e as células NK funcionam como uma primeira linha de defesa contra a infecção por *Plasmodium spp.* Ambas os tipos de células são responsáveis pela secreção inicial de citocinas. Os macrófagos produzem interleucina 12 (IL-12) que ativa as células NK, fonte inicial de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); ambas as citocinas junto com a IL-12 favorecem o estabelecimento da resposta imune celular (Abbas *et al.*, 2000). As células NK, através da secreção de citocinas e não por sua atividade citolítica, têm uma participação importante servindo de ponte entre os mecanismos de resistência inata e a imunidade adaptativa durante a fase eritrocítica da infecção. O hospedeiro responde inespecificamente à infecção por aumento do número de monócitos no sangue periférico e por acumulação de macrófagos no baço e no fígado. Os macrófagos ajudam o controlo da infecção através da fagocitose de eritrócitos parasitados, na secreção de citocinas (IL-12, IL-1 e TNF- α) e na produção de metabolitos reativos do oxigénio e óxido nítrico (Legorreta-Herrera & Sánchez-Cruz, 1999). Ainda que os macrófagos não consigam evitar o aumento da parasitémia durante a fase inicial da infecção, durante a fase de crise têm uma participação fundamental na eliminação de eritrócitos parasitados.

Por outro lado, os linfócitos T CD4⁺ são células fundamentais para o estabelecimento tanto da resposta imune humoral como da celular (Garraud *et al.*, 2003). Os linfócitos T CD4⁺ podem dividir-se nas subpopulações: Th1 e Th2, de acordo com o repertório de produção de citocinas secretadas depois da sua ativação. Os linfócitos de perfil Th1 produzem a IL-2, o IFN- γ e o TNF- α . Através destas citocinas se ativam os macrófagos e a resposta de hipersensibilidade retardada. Os linfócitos de perfil Th2 produzem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, estimulando assim a diferenciação dos linfócitos B a células plasmáticas e a produção de anticorpos (Abbas *et al.*, 2000). Desta forma, os linfócitos T CD4⁺ Th1 e Th2 mediam respostas imunes qualitativamente diferentes. A subpopulação Th1 favorece uma resposta do tipo celular e a subpopulação Th2 uma resposta de tipo humoral. As relativas contribuições destas duas subpopulações parecem mudar durante o curso da infecção pelo *Plasmodium spp.*; Th1 predomina durante a fase aguda e Th2 durante as fases tardias da infecção (Taylor-Robinson *et al.*, 1993). Não obstante, no ser humano temos dados que mostram que debaixo de certas circunstâncias se pode apresentar uma resposta Th2 pronunciada que

se transforma em Th1 provavelmente induzida pela eliminação do parasita (Legorreta-Herrera & Sánchez-Cruz, 1999).

Existe outra população de linfócitos que expressa as cadeias $\gamma\delta$ no seu recetor. Estes linfócitos aumentam até 40 vezes ou mais no sangue de indivíduos com infeção aguda por *P. falciparum*, para além disso, a elevação mantém-se por várias semanas durante a convalescença (Langhorne *et al.*, 1992). Este aumento sugere a participação destas células no controlo da infeção, embora, em experiências utilizando murganhos que carecem da dita subpopulação celular, se encontrou resultados contraditórios. Os murganhos com infeção por *P. chabaudi adami* requerem a população $\gamma\delta$ para controlar a infeção. Para além disso, as células $\gamma\delta$ evitam o desenvolvimento de *P. yoelii* no fígado dos murganhos sem células T $\alpha\beta$ ao passo que nos murganhos infetados com *P. chabaudi chabaudi*, as células $\gamma\delta$ pareceram não ter nenhuma função importante (Taylor-Robinson *et al.*, 1993). É provável que a participação destas células dependa especificamente da espécie de parasita. Por outro lado, os ratinhos que carecem dos linfócitos T $\alpha\beta$ ($CD4^+$ e $CD8^+$) não controlam a infeção e morrem rapidamente.

Na malária murina os linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos (CTL's) têm uma função importante no controlo da infeção nas células hepáticas, no entanto não podem intervir na fase eritrocítica da infeção, já que os eritrócitos não têm a capacidade de processar antígenos do *Plasmodium spp* que sejam reconhecidos pelos CTL's. Não obstante, existem evidências da participação dos CTL's para eliminar o parasita durante a etapa final da infeção evitando a cronicidade da parasitemia. Na infeção nos seres humanos os linfócitos T $CD8^+$ não têm atividade citotóxica contra as células hepáticas infectadas pelo *Plasmodium spp*. No entanto, considera-se que esta subpopulação celular participa no controlo da doença, regulando a resposta imune devido à produção de citocinas (Offeddu *et al.*, 2012).

Os murganhos deficientes em células B (quando depletados com anticorpos monoclonais ou devido a que geneticamente se tenha eliminado essa população) controlam a infeção aguda, não obstante a parasitemia se tornar crónica. Ao que parece, nestes murganhos prevalece uma resposta tipo Th1, e ao não poder transformar se numa resposta tipo Th2, não é possível a completa eliminação do *Plasmodium spp*. Pelo contrário, os murganhos que possuem sua população de células B intatas são capazes de

eliminar o parasita. É provável então, que as células B sejam necessárias para reprimir a resposta Th1 e/ou gerar uma resposta protetora imune mediada por Th2 (Legorreta-Herrera & Sánchez-Cruz, 1999).

1.7 IMUNIDADE HUMORAL ESPECÍFICA DO ESTÁGIO ERITROCITÁRIO

Nas áreas de transmissão intensa de *P. falciparum*, a imunidade clínica aos estádios sanguíneos da infecção pode ser adquirida depois de muitos anos de infecções repetidas (Hviid, 2005). Esta imunidade reduz o risco de crises severas de malária, mas não impede a existência de parasitemia. A imunidade adquirida contra a malária é altamente prevalente em adultos e o grau de imunidade contra a doença grave adquirida com a primeira infecção parece aumentar com a endemicidade (Gupta *et al.*, 1999).

O papel dos anticorpos na proteção contra a malária está bem demonstrado pela proteção oferecida ao recém-nascido por anticorpos maternos e é sugerido pela associação positiva do título de anticorpos contra antígenos da malária com a diminuição do risco da doença (Gupta *et al.*, 1999).

A transferência passiva de anticorpos do tipo IgG purificada de soros hiperimunes para doentes com malária tem demonstrado que a IgG confere proteção para a doença. No entanto os mecanismos que envolvem a aquisição natural de IgG como proteção não estão completamente esclarecidos (Tuan *et al.*, 2012). Várias investigações e referências a infecções acidentais por malária entre os recetores de sangue, em países não endêmicos, de dadores com antecedentes de infecção por malária mostraram claramente que infecções assintomáticas por *P. falciparum* podem persistir durante uma década ou mais (confirmadas até ao máximo de 13 anos) (Hassanpour *et al.*, 2011).

Dados atuais mostram que a produção de anticorpos contra o parasita na sua fase sanguínea é potencialmente benéfica quer para reduzir a parasitemia por fagocitose dos macrófagos dependentes do recetor Fcy, quer produzindo uma robusta resposta inflamatória (Zhou *et al.*, 2012). A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é um passo fundamental no estabelecimento da infecção, e, portanto, é provável que seja um alvo importante da resposta imune protetora. O processo envolve uma complexa cascata de eventos envolvendo interações entre os eritrócitos e as proteínas do parasita, incluindo

as proteínas de superfície do merozoito (MSP1 a 11), as de superfície do eritrócito, as do vacúolo parasitóforo entre outras (Shi *et al.*, 1996). Devido à limitada exposição destas proteínas ao sistema imune do hospedeiro, é provável serem os anticorpos a principal forma de imunidade contra os merozoitos. Anticorpos protetores são dirigidos contra as proteínas dos merozoitos e variantes antigénicas de superfície expressos nos eritrócitos infetados (Garraud *et al.*, 2003).

Os mecanismos para proteção que têm sido propostos incluem inibição do crescimento do parasita, neutralização das proteínas de superfície envolvidas na penetração dos eritrócitos pelos merozoitos, inibição da sequestração dos eritrócitos parasitados, e promoção da morte do parasita, ou fagocitose por mecanismos dependentes via do recetor Fcγ (Zhou *et al.*, 2012).

Recentemente se sugere que anticorpos contra *PfEMP1* podem reduzir a densidade parasitária por disrupção das rosetas, um mecanismo que tem sido associado também à proteção na malária grave (Rovira-Vallbona *et al.*, 2012).

Anticorpos denominados citofílicos podem cooperar com os monócitos por via FcγRI e FcγRII recetores de opsonização e fagocitose ou participar na inibição celular mediada por anticorpos e também na citotoxicidade celular mediada por anticorpos (Groux & Gysin, 1990). A proteção contra a fase sanguínea do ciclo do *Plasmodium spp* depende da proporção de anticorpos citofílicos específicos e a proporção relativa de anticorpos não citofílicos.

Os primeiros anticorpos a aparecer na fase aguda da infeção são os chamados não citofílicos (IgG2, IgG4 e IgM) e gradualmente esta resposta se transforma na classe citofílica (IgG1 e IgG3). O anticorpo do tipo IgG2 é dirigido contra antígenos de elevado peso molecular ao contrário dos anticorpos do tipo IgG1 e IgG3 que são produzidos contra antígenos de baixo peso molecular, mas esta resposta não é precedida da IgG2 correspondente (Abbas *et al.*, 2000).

A proteção de ambas, crianças e mulheres grávidas, associada a produção de anticorpos tem sido demonstrada envolvendo principalmente os anticorpos citofílicos do tipo IgG das subclasses IgG1 e IgG3, o que sugere um papel para os recetores via Fcγ na proteção (Aribot *et al.*, 1996). Só estes anticorpos são capazes de mediar a opsonização dos eritrócitos infetados (Groux & Gysin, 1990). Por outro lado, anticorpos não citofílicos, como por exemplo o anticorpo do tipo IgG4, podem inibir mecanismos

executores por competição com anticorpos citofílicos e ser considerado como não protetor (Mibei *et al.*, 2008, Groux & Gysin, 1990).

Os níveis de IgE também estão elevados em indivíduos infetados com malária. Há uma correlação negativa entre os níveis de IgE e a parasitemia placentária e os níveis de plaquetas e hemoglobina. Os valores de IgE são mais elevados na malária cerebral do que na malária não complicada (Mibei *et al.*, 2008).

Os níveis de IgM têm sido associados com redução do risco de malária grave nas crianças e adolescentes e negativamente correlacionados com a densidade parasitária, sugerindo que a IgM é capaz de controlar a infecção através de limitação precoce do crescimento do parasita ou por bloqueio da produção da TNF- α pró-inflamatória (Rovira-Vallbona *et al.*, 2012). Estes achados parecem contraditórios com outras investigações onde a IgM é a classe de imunoglobulina predominante na ligação à superfície dos eritrócitos parasitados que formam as rosetas (Rowe *et al.*, 2002).

Os eritrócitos infetados com trofozoitos são eliminados no baço, fígado e placenta pelos monócitos e macrófagos teciduais derivados dos monócitos. Anticorpos dirigidos contra às proteínas de superfície dos eritrócitos parasitados com trofozoitos opsonizam os eritrócitos parasitados e promovem a sua remoção por eritrofagocitose (Groux & Gysin, 1990). Contudo a natureza da resposta imune adaptativa e inata que promove a aquisição da IgG protetora, a especificidade antigénica da IgG protetora, e mecanismos pelos quais outros componentes do sistema imune, inato e adaptativo, contribuem para a proteção contra a malária nos seres humanos permanece pouco claro (Narsaria *et al.*, 2011).

1.8 MEDIADORES SOLÚVEIS DA INFLAMAÇÃO

O papel da inflamação na patogénese da malária não está bem compreendido. As substâncias invocadas na destruição e morte dos parasitas, como citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigénio e óxido nítrico, jogam um papel duplo durante a infecção por sua participação na patogénia.

Também pouco clara é a extensão pela qual a regulação da inflamação induzida pelo *P. falciparum* contribui para a proteção da malária não complicada e malária grave e os

mecanismos pelos quais isto pode ocorrer, assim como os mecanismos pelos quais *P. falciparum* modela a resposta imune para se evitar a sua eliminação (Costa *et al.*, 2015). A citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi descoberta como uma das principais citocinas relacionadas com os processos inflamatórios e respostas imunes (Abbas *et al.*, 2000). Esta citocina participa na defesa do hospedeiro contra as infeções, aumentando a expressão das moléculas de adesão, a circulação de células no sítio de infeção e estimulando os macrófagos e neutrófilos à fagocitose, assim como a liberação de outras citocinas e mediadores inflamatórios (Costa *et al.*, 2015).

Na malária humana a TNF- α foi a primeira citocina demonstrada e está presente em níveis elevados no plasma de doentes com malária grave por *P. falciparum*. A literatura relaciona os níveis elevados de TNF- α com a indução da patogenia da malária grave, particularmente na malária cerebral, mas os resultados das pesquisas mais recentes não são conclusivos (Costa *et al.*, 2015).

Os macrófagos são os principais tipos celulares produtores de TNF- α . Além deles, linfócitos T e B, monócitos e fibroblastos também podem produzir esta citocina. A expressão do gene TNF- α acontece através de inúmeras vias de sinalização celular e, na grande maioria das células, ele não é expresso sem que haja uma estimulação prévia. É necessário que a célula seja exposta a estímulos para que haja a produção de TNF- α . O indutor mais potente de TNF- α por monócitos é o lipopolissacarídeo (LPS). Estudos visando a identificação de fatores importantes para a transcrição do gene TNF- α mostraram que a via de transdução de sinal do TNF- α se dá através de dois recetores de membrana – TNFR1 e TNFR2 fazendo com que esta citocina exerça um número variado de importantes funções celulares incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (Abbas *et al.*, 2000). A citocina TNF- α interage com as células endoteliais para induzir o aparecimento de moléculas de adesão, como a molécula de adesão (*intercellular adhesion molecule* – ICAM-1), a molécula de adesão celular vascular (*vascular cell adhesion molecule1*-VCAM-1) e a E-selectina, permitindo, assim, a saída de granulócitos da circulação sanguínea para o local da inflamação (Foreman *et al.*, 1996).

Mais recentemente, tem sido proposto que a TNF- α , está envolvida na regulação do metabolismo de ferro e no desenvolvimento da anemia grave na malária por *P. vivax*. De facto, essa citocina pode bloquear a diferenciação e proliferação de células

progenitoras eritroides, causando uma deficiência de glóbulos vermelhos maduros no sangue (Clark & Chaudhri, 1988).

Surpreendentemente, nos seres humanos só têm sido recolhidas indicações indiretas e fragmentadas do papel da IFN- γ na imunidade pré-eritrocítica na malária. A atuação de IFN- γ na malária pode caminhar para dois diferentes cenários. A produção inicial da citocina pode estar associada com mecanismos executores eficientes e intensificar a habilidade para controlar a infecção. Alternativamente a produção rápida de IFN- γ pode predispor a uma super produção de citocinas inflamatórias e a um maior risco de evolução para a doença grave (Costa *et al.*, 2015). O IFN- γ tem propriedades reconhecidas antivirais e citotóxicas. Nas áreas endémicas de malária, as populações são expostas a grande variedade de outras infeções, particularmente de origem viral. Esta poderá ser a razão, porque infeções virais podem induzir níveis substancialmente elevados de IFN- γ e nesta situação talvez não possa ser utilizado como um marcador de resposta à infeção pelo *Plasmodium spp.* Mas entretanto num estudo coorte de 107 crianças Quenianas dos 6 meses aos 2 anos de idade verificou-se que as crianças com valores mais elevados de IFN- γ em resposta a antígenos pré-eritrocitários apresentavam menos anemia e que o primeiro episódio febril com parasitemia surgia mais tarde, sugerindo-se que a IFN- γ possa ser usado como um marcador da imunidade protetora associado a malária com anemia nas crianças de áreas holo endémicas (Ong'echa *et al.*, 2003).

A designação da proteína C reativa (CRP- do inglês – *C reactive protein*) deriva da sua afinidade para se ligar ao polissacarídeo C do *Streptococcus pneumoniae*. É uma proteína não específica da fase aguda e um marcador clássico da inflamação. Os níveis de CRP elevam-se várias vezes depois de um evento agudo com forte correlação entre a duração, a intensidade do estímulo e o número de hepatócitos sintetizadores de CRP (Zhou *et al.*, 2012). Os níveis normais de CRP não estão bem definidos e o aumento dos níveis da CRP associados com morbilidade variam largamente (Hurt *et al.*, 1994). Vestígios da CRP são encontrados no plasma nos indivíduos saudáveis e aumentam em concentração de 100 a 10.000 vezes durante a inflamação aguda e em situações de doença, incluindo infeções (Giha *et al.*, 2010). Pequenos acontecimentos tais como exercício físico podem resultar em elevação da CRP em cerca de 10 mg por litro, sugerindo a presença de um processo inflamatório ou de destruição tecidual (Hurt *et al.*,

1994). Deste modo, a CRP é um bom marcador de processo inflamatório que se monitoriza diariamente, e pode também jogar um papel modulador no local da inflamação.

Nos seres humanos o envolvimento da CRP na defesa contra as infeções é parcialmente devido à sua capacidade para transportar a fosfatidilcolina (PC) nas membranas dos microrganismos (Giha *et al.*, 2010). CRP mostra habilidade para se ligar com a parede celular polissacarídea pneumococal através da fosforilcolina de uma maneira cálcio dependente. É também capaz de se ligar a vasta série de ligandos, incluindo certas membranas fosfolipídicas, cromatina e a vários outros substratos biológicos (Ansar *et al.*, 2006) e estão bem documentadas ligações complexas da CRP aos neutrófilos humanos e monócitos.

A função biológica da CRP e a regulação dos níveis da CRP não estão completamente compreendidos. A CRP está envolvida na coagulação do sangue, fibrinólise, ativação das vias do complemento, opsonização das bactérias e destoxificação dos corpos estranhos. As interleucinas 1 e 6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estimulam a libertação da CRP dos hepatócitos levando à subida dramática da CRP no soro. Para além disso, foi descrito um mecanismo positivo de retro informação da CRP nas células do sangue que produzem essas citocinas e foi confirmado que os produtos finais da CRP têm potente atividade imunomoduladora (Giha *et al.*, 2010).

Apesar do papel patológico da CRP nas doenças cardiovasculares ter sido extensamente pesquisado, o seu papel nas infeções parasitárias, mais especificamente na malária, tem sido menos investigado (Giha *et al.*, 2010). A CRP está identificada como um elemento crítico durante a infeção por malária e há uma forte associação de níveis elevados da CRP durante a fase aguda da malária grave e outras formas clínicas da malária (Zhou *et al.*, 2012). Na malária a secreção de CRP é induzida pelas citocinas proinflamatórias secretadas pelo hospedeiro nos monócitos/macrófagos, e foram encontradas correlações fortes entre os níveis de CRP e as parasitémias. Estudos recentes sugerem que a CRP atua através de Fc γ R para reduzir a inflamação e proteger contra certas doenças autoimunes. Estruturalmente, a CRP tem uma sequência homóloga (domínios partilhados) à Fc γ R que estabelece ligação com a IgG. Para além disso, a CRP tem alta afinidade ao alelo R131, produto do gene Fc γ RIIa, um alelo que tem sido associado com a proteção contra a malária. Assim, a CRP poderá ser um competidor natural para

as ligações do anticorpo IgG anti-malárico na fagocitose e para outras células que contêm FcγR. Aparentemente nas crianças africanas saudáveis foram encontrados níveis mais elevados de CRP comparadas com crianças europeias e da Papua Nova Guiné, o que poderá indicar parasitação crónica por malária para as primeiras populações. O gene CRP é altamente polimorfo, com SNPs identificados em vários *locus*. O alelo A está associado com níveis basais mais elevados de CRP. A distribuição dos genótipos e alelos da CRP é diferente geográfica e etnicamente. Estudos prévios mostraram que o alelo A é mais frequente nos Africanos do que nos Caucasianos, e poderá conferir uma vantagem de sobrevivência para os habitantes das áreas endémicas de malária (Giha *et al.*, 2010).

Existe acordo sobre o facto dos níveis da CRP na malária serem mais elevados nas crianças. Sob exposição constante ao *P. falciparum* a imunidade desenvolve-se com a idade, a resposta por citocinas torna-se mais moderada e a morbidade da malária de menor gravidade. As alterações nos níveis de CRP observadas nas crianças com malária funcionam como um fator prognóstico. Por exemplo, crianças mais velhas com hiperparasitemia têm níveis mais baixos de CRP do que as mais novas, existindo a probabilidade dos níveis de CRP para uma dada parasitemia alterarem com a idade. Isto indica um certo grau de tolerância aos parasitas da malária. Sugere-se assim que o mesmo nível de CRP não tem o mesmo significado clínico em idades diferentes (Hurt *et al.*, 1994).

Os doentes com malária têm aumento na produção de agentes oxidantes e redução nas defesas antioxidantes, o que favorece o “*stress*” oxidativo. Três fontes podem contribuir para a geração de espécies oxidantes na malária: a degradação da hemoglobina pelos parasitas intraeritrocitários, a produção de espécies reativas de oxigénio por polimorfonucleares sanguíneos, como primeira linha de defesa para destruir parasitas e a ativação de citocinas pró-inflamatórias que estimulando a produção de anticorpos contra antígenos do parasita que vão gerar formas de óxido nítrico sintetase (iNO) (Clark & Schofield, 2000); num estudo efetuado numa amostra de meninos da Gâmbia com malária por *P. falciparum*, os granulócitos mostraram ter grande capacidade de produzir espécies reativas de oxigénio e a geração destas espécies reativas se relacionou com a rápida eliminação da parasitemia (Narsaria *et al.*, 2011).

Há algum tempo se especula a participação das plaquetas na fisiopatologia da malária grave por *P. falciparum*, uma vez que a proteína PfEMP1 do parasita pode ligar-se às plaquetas expressando CD36, e essas por sua vez podem ligar-se ao endotélio aumentando a adesão de eritrócitos infectados. A diversidade de recetores encontrados nas plaquetas sugere a interação destas partículas com células do sangue, sistema imune, sistema endócrino e sistema nervoso. A ativação plaquetária pode ainda induzir a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, o que aumenta a resposta inflamatória durante a malária. Por outro lado, essa ativação pode levar a trombocitopenia o que acaba reduzindo a adesão de eritrócitos infectados, uma vez que, com a diminuição de plaquetas no sangue passam a existir também poucos recetores disponíveis para a adesão dos eritrócitos. Vários mecanismos imunológicos, entre os quais o "stress" oxidativo por exemplo, têm sido sugeridos como causa da destruição de plaquetas (Clark & Schofield, 2000). Entretanto, a patogénese da perda de plaquetas associada a malária grave é muito pouco esclarecida, tendo sido estudada principalmente em modelos de malária murina. Nestes modelos, tem sido proposto que as plaquetas podem agravar a malária por contribuir para a adesão de leucócitos ou por permitir a ativação endotelial. Consequentemente, o papel das plaquetas na patogénese da malária, bem como em outras doenças inflamatórias e infecciosas, tem sido um assunto de grande interesse. A redução do número de plaquetas tem sido associada à malária grave causada por *P. falciparum*, e apesar do achado não ser consensual, a trombocitopenia não tem sido um critério para a classificação de malária grave pela WHO. Mais recentemente, nas publicações de casos de malária com complicações causada por *P. vivax* tem sido demonstrada, sistematicamente, plaquetopenia.

1.9 REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E AS IMPLICAÇÕES NA PATOGÉNESE DA MALÁRIA

A hipótese de que a activação excessiva do complemento contribui para a malária grave tem sido amplamente investigada. CR1, um recetor para os imunocomplexos que contém C3b, medeia a inativação de C3b e a remoção dos imunocomplexos pelos macrófagos no baço e fígado (Cornacoff *et al.*, 1983). CR1 e CD55 previnem a formação de C3/C5 convertases e CD59 previne a formação de MAC nas superfícies celulares. Níveis baixos de proteínas reguladoras (CD55 e CR1) nas superfícies dos

eritrócitos têm mostrado associação com depósitos aumentados de C3b (Owuor *et al.*, 2008, Ansar *et al.*, 2009) e contribuem para aumentar a destruição dos eritrócitos e a anemia que acontece depois da infecção por *P. falciparum* (Waitumbi *et al.*, 2000).

A destruição dos eritrócitos infetados pelos monócitos e macrófagos é importante para o controlo da infecção e na limitação da inflamação excessiva induzida pela rotura destes eritrócitos infetados. O bloqueio da deposição do complemento mostrou prevenir em 80 a 95% a fagocitose *in vitro* dos eritrócitos infetados com formas imaturas do parasita (Turrini *et al.*, 1992). Os recetores C3b, CR1 (CD35) é um recetor fagocítico importante dos eritrócitos infetados em fase de anel (Ayí *et al.*, 2004). Sugere-se que o *stress* oxidativo que resulta do metabolismo parasitário pode resultar na formação do hemicromo que pode comandar a deposição da proteína de membrana na banda 3, opsonização pela ocorrência natural de anticorpos anti-banda 3 e ativação do complemento via CP, que é então inativado pela ligação a CR1 (Arese *et al.*, 2005). Pensa-se que uma eficiente destruição acentuada por este mecanismo está subjacente ao efeito protetor de vários polimorfismos dos eritrócitos contra a infecção por *P. falciparum* (Ayí *et al.*, 2004). Contudo, este processo benigno pode transformar-se em deletério quando ocorre em excesso. A mediação de polimorfismos de CR1 em doentes Africanos na interação entre eritrócitos e PfEMP1 pode estar associado às formas graves da malária (Rowe *et al.*, 1997). A activação excessiva do complemento pode também contribuir para a inflamação sistémica, ativação endotelial e bloqueio mecânico da microcirculação, todas associadas com disfunção de órgãos característica da malária cerebral e da malária placentária. C3a e C5a exercem um vasto leque de funções biológicas pela interação com seus respetivos recetores (C3Ar e C5Ar), localizados nas células mieloides (monócitos/ macrófagos, células mastóides e microglia) e células não mieloides (astrócitos, células endoteliais) (Klos *et al.*, 2009). Conroy e colaboradores demonstraram *in vitro* que alguns produtos do parasita tais como PfGPI podem ativar a expressão de CD88 dos monócitos (recetor de C5a) originando uma ampla resposta inflamatória e anti-angiogénica, mecanismo que pode explicar a malária placentária em primigestas no Quênia (Conroy *et al.*, 2009). Adicionalmente, C5a, e em menor grau C3a, regulam a expressão das quimiocinas e a sua função como poderosas quimioatrantes para os monócitos, neutrófilos e linfócitos ativados, contribuindo para o recrutamento das células imunes para o local da

inflamação e lesão (Klos *et al.*, 2009). A infiltração pelos monócitos e macrófagos nos órgãos chave aumenta o risco de mau prognóstico nas mulheres grávidas na malária placentária (Rogerson *et al.*, 2003) e na severidade da doença na malária cerebral (Schofield *et al.*, 2007). Parasitas sequestrados são capazes de induzir altos níveis plasmáticos de C5a e suprarregulação de C5Ar nos macrófagos que ampliam o processo inflamatório (Conroy *et al.*, 2009a). Em conjunto, estes resultados sugerem que o complemento pode mediar a secreção de citocinas e quimiocinas característica da patogênese da malária cerebral e malária placentária. O complemento pode também mediar a ativação endotelial. As células endoteliais humanas estimuladas por C5a exibem uma expressão de moléculas de adesão incluindo E-selectin, ICAM-1 e VCAM-1 (Albrecht & Ward, 2004, Foreman *et al.*, 1996). A suprarregulação destas moléculas de adesão facilita a aderência aos eritrócitos, leucócitos e plaquetas aos vasos sanguíneos (Wassmer *et al.*, 2003) que parece contribuir para a lesão vascular e para as alterações dos órgãos chave observada na malária cerebral e placentária (Dondorp *et al.*, 2004). As proteínas do complemento, e os mediadores da inflamação dependentes do complemento (histamina e TNF), podem também induzir exocitose dos grânulos armazenados nas células endoteliais ativadas. Níveis elevados do fator procoagulante von Willebrand e o fator angiogénico angiopoietin-2 estão associados com a gravidade da malária (Larkin *et al.*, 2009, Lovegrove *et al.*, 2009, Conroy *et al.*, 2009). Existe evidência crescente do papel da coagulação intravascular dessiminada, formação de trombina e recrutamento das plaquetas ativadas na gravidade e prognóstico da doença por *P.falciparum* (Francischetti *et al.*, 2008). Markiewski e colaboradores mostraram que a ativação dos componentes do complemento e dos mediadores inflamatórios dependentes do complemento têm propriedades procoagulantes e potenciam diretamente a coagulação intravascular dessiminada na malária grave (Markiewski *et al.*, 2007). A atividade pro-coagulante do complemento é atribuída à sua habilidade para induzir a ativação das plaquetas e agregação, e aumentar a expressão pró-coagulante do fator tecidual (FT) na superfície dos leucócitos e células (Muhlfelder *et al.*, 1979). Para além disso, tem sido demonstrado que C5a contribui para a pro-coagulação através da ativação dos mastócitos e basófilos, que podem mediar a formação da trombina (Wojta *et al.*, 2002). Os componentes da cascata da coagulação podem iniciar a ativação do complemento. Contudo, a interação sinérgica destes dois braços do sistema imune inato

tem grandes implicações para o mecanismo patogénico da doença. São necessários mais estudos para definir o mecanismo preciso de interação que conduz à amplificação destes dois sistemas efetores da imunidade inata.

Em conclusão, o sistema do complemento é ativado por múltiplas vias em resposta à infeção por *P. falciparum*. Contudo é um campo que deve ser explorado para o tratamento adjuvante da malária grave.

1.10 TRATAMENTO DA MALÁRIA GRAVE

De acordo com a WHO (WHO, 2012) as medidas seguintes devem ser tomadas para todos os doentes com diagnóstico clínico ou suspeita de malária grave:

- Fazer uma rápida avaliação clínica e ter especial atenção ao estado geral e nível de consciência, tensão arterial, frequência e tipo de respiração e palidez. Pesquisar rigidez da nuca e examinar presença de *rash* para excluir diagnósticos alternativos.
- Internar o doente numa unidade ou sala para doentes agudos ou próximo a uma sala de enfermagem se for numa enfermaria geral, para melhor monitorização. Contudo, se indicado e possível, admitir o doente numa unidade de cuidados intensivos.
- Fazer uma rápida e inicial medição da glicemia, corrigir a hipoglicemia se presente e então monitorizar com frequência a hipoglicemia.
- Se possível examinar o fundo do olho. Manchas retinianas esbranquiçadas, alterações vasculares ou hemorragias, se presentes, ajudarão o diagnóstico. O exame raramente revela papiledema, que é uma contraindicação para a punção lombar.
- Tratar as convulsões com uma benzodiazepina (diazepam intravenoso, midazolam ou lorazepam). Se um episódio convulsivo persiste mais do que 10 minutos depois da primeira dose, dar uma segunda dose de uma benzodiazepina (diazepam, midazolam ou lorazepam). A dose total de benzodiazepina não deve exceder 1 mg por Kg de peso corporal nas 24 horas.
- Convulsões que persistem (estado epilético) apesar do uso de duas doses destas drogas são um problema difícil. Para tais casos deve-se dar fenitoína: 18mg por kg peso corporal intravenosamente, ou fenobarbital 15mg por kg peso corporal intramuscular ou intravenosa, se é a única opção possível. A respiração deve ser monitorizada repetidamente, se foi administrada uma dose alta de fenobarbital (20mg por kg peso

corporal) por ser um risco aumentado para a morte e o doente pode precisar de ventilação assistida.

- Se a confirmação parasitológica de malária não está prontamente disponível, fazer uma lâmina e começar o tratamento para malária grave com base na apresentação clínica. Os testes rápidos de diagnóstico são uma boa alternativa para aplicação nas áreas de atendimento urgente.
- Dar artesunato intravenosamente. Se o artesunato não está disponível dar artemether intramuscular ou quinino intravenoso. Se a administração intravenosa não é possível o artesunato ou o quinino podem ser administrados intramuscularmente na coxa. Supositórios de artemisinina e seus derivados poderão ser administrados como tratamento nos locais de pré-referência, onde a terapêutica parentérica com artesunato ou quinino não é possível ou não está disponível. Dar agentes anti-maláricos parentéricos no tratamento da malária grave durante o mínimo de 24 horas, mesmo se o doente é capaz de tolerar a medicação oral mais cedo.
- Logo a seguir, prescrever um curso de tratamento completo com medicamentos combinados com base na artemisinina, que seja eficaz na área onde a infecção foi adquirida.
- Calcular a dose de artesunato, arthemeter ou quinino como mg/ kg de peso corporal. Todos os doentes devem ser pesados, se não for possível, o peso do doente deverá ser estimado.
- Providenciar bons cuidados de enfermagem é vital, principalmente para o doente inconsciente. Prestar particular atenção ao balanço hídrico na malária grave de modo a evitar quer a sobre hidratação quer a desidratação. As necessidades individuais variam largamente, dependendo das perdas de fluidos antes da admissão. Crianças com malária grave que são incapazes de reter fluidos por via oral devem ser tratadas com soros de manutenção 5% dextrose e soro fisiológico (0.9%) a (3-4 mL por kg/ hora), e adultos a 1-2mL por kg peso corporal por hora, até que o doente esteja capaz de tomar ou reter fluidos por via oral. A desidratação deve ser manejada cautelosamente e, idealmente, o guia deve ser o débito urinário (com uma meta de *output* urinário superior a 1mL por kg peso corporal por hora) a não ser que o doente tenha uma insuficiência renal anúrica ou edema pulmonar, que obriga à gestão rigorosa dos fluidos de acordo com as necessidades do doente, reavaliadas com frequência.

- Ter a certeza que procurou outras causas tratáveis de coma. A meningite deverá ser excluída por punção lombar. Se a punção lombar está contra-indicada ou não está disponível, o doente deverá receber tratamento antibiótico de presunção.
- Procure e trate qualquer outra complicação ou infeção associada.
- Registe o débito urinário, e procure pela coloração da urina acastanhada ou negra (hemoglobínúria) ou oligúria, que deve indicar lesão renal aguda.
- Monitorar a resposta ao tratamento, quer clínica quer parasitológica, por observação regular e das lâminas sanguíneas.
- Monitorar regularmente a temperatura (de preferência rectal), a frequência respiratória e a profundidade da respiração, pulso, pressão sanguínea e nível de consciência.
- Estas observações permitirão a identificação de complicações tais como a hipoglicemia, a acidose metabólica (indicada pela presença ou desenvolvimento de respiração profunda), edema pulmonar e choque. Em crianças, o tempo de preenchimento capilar > 2s, muitas vezes associada com outros sinais de perfusão insuficiente denota um grupo de alto risco que deve ser monitorizado mais de perto.
- Reduzir a alta temperatura corporal (> 39°C) pela administração de paracetamol como antipirético.
- Obter avaliação regular do hematócrito ou da concentração da hemoglobina, glicémia, ureia ou creatinina e eletrólitos.
- Evitar drogas que aumentem o risco de hemorragias gastrointestinais (aspirina, corticosteroides).
- Monitorização mais sofisticada (por exemplo, medidas do pH arterial, gases do sangue) pode ser útil se o doente desenvolve complicações. Isso dependerá dos equipamentos, experiência e capacidades técnicas locais.

Todas estas medidas devem constar de um protocolo de diagnóstico e tratamento que deverá ser divulgado entre os profissionais que trabalham nos locais onde a malária é endémica.

1.11 SCORES DE GRAVIDADE E PROGNÓSTICO QUE SÃO APLICADOS NAS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS

Malária por *P. falciparum* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento. Malária grave está associada com várias complicações. A WHO enumera uma listagem de complicações (WHO, 2012), mas não foi nomeada a importância de cada uma delas. É bem conhecida que a presença de múltiplas complicações resulta no aumento da mortalidade. Na malária grave a presença de gravidez torna o parto desastroso. De igual forma, Marsh e colaboradores reportaram a dificuldade respiratória como um indicador de ameaça de vida num estudo efectuado no Quênia com uma amostra de 1844 crianças com malária por *P. falciparum* (Marsh *et al.*, 1995). As altas parasitémias provocadas pelo *P. falciparum* (maiores ou iguais a 5% de eritrócitos infetados) são relacionadas com apresentações mais graves de malária, tanto pelo maior compromisso da microcirculação, quanto pela presença de efeitos metabólicos deletérios, como a hipoglicemia e a acidose láctica. O papel da inflamação na patogénese da malária não está bem compreendido. As substâncias evocadas para a destruição e morte dos parasitas (as citoquinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigénio e óxido nítrico) jogam um papel duplo durante a infeção devido à sua participação simultânea na patogenia. Os doentes apresentam quadros laboratoriais que comprovam a secreção da maior parte dos mediadores que intervêm na sépsis tal como uma síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS) de origem infecciosa (Mackintosh *et al.*, 2004), com possibilidade de evoluir para disfunção múltipla de órgãos e sistemas (DMO), sendo uma das mais importantes causas de morte em unidades de terapia intensiva em diversas regiões do mundo (Cabré *et al.*, 2005). Os critérios de SIRS foram discutidos na conferência de consenso em 1992, conduzida pelo *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), onde as definições e terminologia associada com as sepsis e suas sequelas foram clarificadas (tabela 3). Em Dezembro de 2001, considerando que os critérios de SIRS, embora sensíveis e úteis, são pouco específicos, uma segunda conferência foi organizada pelo ACCP, SCCM, a *American Thoracic Society*, a *European Society of Intensive Care Medicine* e ainda a *Surgical Infection Society* para atualizar as definições originais no que se refere às definições de sépsis. O resultado desta Conferência

permitiu a adoção de um novo sistema de estratificação de risco, denominado de PIRO que parece interessante e promissor e que estratifica os doentes com base em condições predisponentes, natureza e extensão do insulto, natureza e magnitude da resposta do hospedeiro e grau de disfunções de órgãos.

Tabela 3. Sinais que caracterizam a Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica

Temperatura	> 38° C ou < 36° C
Frequência cardíaca	> 90 batimentos/min
Frequência respiratória	> 20 movimentos/min ou PaCO ₂ < 32 mmHg (< 4,3 kPa)
Leucócitos	> 12.000 células/mm ³ , ou < 4.000 células/mm ³ ou > 10% de formas jovens

A síndrome de disfunção múltipla de órgãos (MODS) é uma síndrome clínica envolvente e iniciada por vários estímulos. É a principal causa de morbilidade e mortalidade em doentes admitidos nas UCIs. Quando os doentes têm MODS por vários dias consecutivos e mais de três órgãos afetados, a mortalidade é muito alta. Apesar dos modelos de predição de prognóstico contribuírem significativamente para caracterizar os doentes em estudos coorte, não são particularmente úteis para decisão em doentes individuais. A taxa de mortalidade nas UCIs tem sido correlacionada com o número das falências de órgãos e com o grau de disfunção orgânica (Cabré *et al.*, 2005). A quantificação da disfunção orgânica/falência é importante por várias razões: (1) facilitar a descrição da severidade da doença em diferentes UCIs e diferentes grupos de doentes, (2) minimizar a incapacidade para comparar no tempo ou entre grupos conferindo utilidade em séries clínicas, (3) comparar tratamentos ou avaliar efeitos de tratamentos experimentais e procedimentos sobre a morbilidade (Cabré *et al.*, 2005). Muitos  ndices de severidade têm sido usados para calcular a gravidade da doença, incluindo o *Acute Physiology & Chronic Health Evaluation* (APACHE), o *Simplified Acute Physiology Score* (SAPS), e o *Mortality Prediction Model* (MPM). Estes  ndices são capazes de calcular a mortalidade hospitalar padrão, por exemplo o rácio entre a mortalidade observada e a mortalidade esperada. Contudo estes modelos de predição prognóstica

não avaliam a evolução do doente durante o internamento na UCI, o custo, e deste modo contribuir para limitar de forma útil as decisões a tomar mais tarde de acordo com o curso da doença. Vários instrumentos têm sido desenvolvidos mais recentemente para quantificar a severidade das disfunções multiorgânicas, em particular o *Multiple Organ Dysfunction Score (MODS)*, o *Logistic Organ Dysfunction Score (LODS)* e o *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*. Todos avaliam a disfunção múltipla de órgãos como um fenómeno contínuo e dinâmico e quantificam a disfunção de órgãos individualmente. SOFA e os outros índices não são calculados à admissão mas um pouco antes do início das disfunções múltiplas (Cabré *et al.*, 2005).

O SOFA é um dos *scores* mais simplificados. Foi desenvolvido pela *European Society of Critical Care Medicine (ESCCM)*, em 1994, como um sistema para medir o estado do doente na ICU. Basicamente avalia os seis sistemas orgânicos separadamente. Diferentes variáveis e parâmetros são incluídos em cada sistema orgânico e é atribuída uma pontua     para cada estado de varia     de 0 – 4; cada uma é mais tarde adicionada para calcular o SOFA *score*, (com o máximo de 24 pontos). O *score* aumenta quando a disfun     do sistema orgânico piora, assim a avalia     da disfun     orgânica individual ou falha pode ser feita como uma avalia     do doente no seu todo. SOFA *score* pode ser usado para avaliar todos os doentes numa ICU. SOFA *score* acima de 15 pontos são associados com taxas de mortalidade acima de 90%.

Existem poucos estudos clínicos sobre malária grave nos países em desenvolvimento, em particular estudos com o SOFA *score*.

1.11.1 Score de gravidade e prognóstico específico para a malária grave nos adultos

Molyneux e colegas descreveram indicadores clínicos e de prognóstico nas crianças com malária cerebral (*Malaria prediction Score -MPS*). Contudo, nenhum *score* estava descrito para prever a mortalidade na malária grave e complicada de um modo geral. Um *score*   til seria baseado em variáveis facilmente mensuráveis no leito do doente com parâmetros mínimos de laboratório. Mishra e colaboradores em 2007 (Mishra *et al.*, 2007) descreveram um novo *score* de gravidade e prognóstico específico para doentes adultos com malária grave (MAS) que foi testado em 248 doentes indianos no Hospital Geral Ispat, Rourkela, Estado de Orissa. O estudo de base hospitalar foi

realizado em doentes com mais de 12 anos de idade com diagnóstico de malária grave por *P. falciparum* que preencheram os critérios da WHO. Foi incluída a malária cerebral (coma), anemia grave (hemoglobina <5 g/dL), insuficiência renal (creatinina > 3 mg/dL), síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA), hipoglicemia (glicose <40 mg/dL), colapso circulatório ou choque, coagulação intravascular disseminada, convulsões generalizadas repetidas, acidose metabólica (pH <7,25), hemoglobinúria macroscópica, hiperparasitemia (> 5%) ou icterícia (bilirrubina > 3 mg/dL). Todos os doentes eram sintomáticos.

MAS (Malaria *Score* for Adults) resultou então de uma modificação da fórmula **MPS** (Malaria Prediction *Score*) preconizada por Molyneux e colaboradores e mais direcionada para a malária grave nas crianças. **MAS** varia entre 0 a 10 pontos e é obtido com a seguinte fórmula:

MAS = 1 (anemia severa) + 2 (insuficiência renal aguda) + 3 (*distress* respiratório) + 4 (malária cerebral)

A mortalidade foi calculada em 2% para MSA 0 - 2; 10% para MSA 3-4, 40% de MSA 5-6 e 90% para MSA 7 ou mais. O estudo acima referenciado mostrou uma sensibilidade de 89,9% e um valor preditivo de 94,1% quando 5 é tomado como o valor de corte, embora careça de validação nas diferentes áreas geográficas.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Descrever as características de uma população de doentes com diagnóstico de malária grave por *P. falciparum*, doentes que estiveram internados na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Américo Boavida (HAB) em Luanda entre Maio de 2011 e Junho de 2013, com a finalidade de contribuir para o conhecimento da resposta imune humoral específica na malária grave.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar uma amostra de 101 doentes com diagnóstico de malária grave quanto a: sexo, grupo etário, naturalidade e residência nos últimos seis meses e presença de co-morbilidade.
- Caracterizar a população em estudo quanto ao número e o tipo de disfunção de órgãos.
- Quantificar a gravidade dos doentes da população de estudo utilizando o SOFA *score* e estudar a correlação com a densidade parasitária.
- Comparar a mortalidade esperada pelo SOFA *score* e a taxa de fatalidade observada na população de estudo.
- Caracterizar o estado serológico dos doentes da amostra pelo doseamento de anticorpos totais anti-*plasmodium spp* e anticorpos anti- *P. falciparum* (IgG total, IgM e subpopulações de IgG: IgG1, IgG3 e IgG4)
- Descrever a relação entre a gravidade da doença e a resposta imune específica observada nos doentes da população de estudo.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos no estudo 101 doentes internados no Serviço de Cuidados Intensivos (SCI) do Hospital Américo Boavida em Luanda, doentes selecionados de forma sistemática consecutiva. O estudo foi observacional e prospetivo.

Os critérios de inclusão, utilizados de forma simultânea, foram os seguintes:

- (1) Diagnóstico de infeção por *P. falciparum* (microscopia ótica e/ou teste rápido (TRD) positivos),
- (2) Presença de sintomas e sinais de doença grave (critérios da WHO 2012),
- (3) Presença de duas ou mais disfunções de órgãos à entrada (critérios do SOFA score)

Os doentes com menos de 10 anos de idade e as mulheres grávidas foram excluídos do estudo. Também foram excluídos os doentes com diagnóstico de co-morbilidade que, por si só, poderia justificar a presença de alguma das disfunções de órgãos, nomeadamente:

- Doentes em coma com resultados alterados do exame citoquímico do liquor e/ou alteração na tomografia do crânio;
- Doente com patologia crónica que podia condicionar a progressão para insuficiência renal crónica e que, durante este internamento, não se conseguiu comprovar a agudização da função renal por malária;
- Doentes com doença hepática crónica conhecida ou suspeita e que manifestaram falência hepática durante este episódio de malária;

Os dados foram recolhidos no decorrer dos primeiros três dias de internamento. Foi atribuído um dia de internamento aos doentes que faleceram antes das primeiras 24 horas. Os doentes foram tratados com quinino 20 mg por kg de peso corporal (até ao máximo de 900 mg x dia) em dose inicial e posteriormente a 10 mg por kg de peso corporal sempre diluído em soro dextrosado a 5%, infundido durante 4 horas e repetido

cada 8 horas até que o doente tolerasse a via oral. Foi ainda associada a clindamicina na dose de 200 mg por kg de peso dia, durante 5 dias (de 12/12 horas).

As medidas de suporte vital e hemodinâmico foram garantidas desde a admissão e muitos dos doentes iniciaram estas medidas ainda no Serviço de Urgência de acordo com *guidelines* internacionais. O tratamento de suporte incluiu: transfusão de produtos de sangue nos doentes com Hgb menor que 8 g/dL e concentrado de plaquetas se trombocitopenia menor ou igual a 50.000 por μ L; glucose hipertónica a 50% nos doentes com hipoglicemia, paracetamol (900 mg) para a hiperéxia e oxigénio por máscara. Os doentes em coma com índice de Glasgow menor ou igual a 7 pontos e ou falência respiratória foram entubados e tiveram suporte ventilatório. As técnicas de substituição renal foram garantidas precocemente utilizando a classificação de AKIN.

Para além dos exames laboratoriais de rotina utilizados no SCI para diagnóstico e vigilância da falência de órgãos (hematologia, bioquímica, gasometria, ionograma) foram efetuados também exames imagiológicos (radiologia simples do tórax) e exames para exclusão de patologias associadas tais como serologias (para HIV, leptospira, hepatite B), doseamento de CD4 e CD8, estudo citoquímico do liquor, hemoculturas e tomografia axial computadorizada, sempre que indicado.

Todos os doentes ou seus familiares preencheram o Termo de Consentimento Informado que foi redigido de forma simples e direta considerando a baixa escolaridade média dos utentes do hospital na generalidade. A assinatura do Termo de Consentimento Informado foi precedida de entrevista com os familiares durante a qual foram explicados os objetivos e métodos do estudo. Também foi explicado aos familiares que os doentes não teriam tratamento nem medidas médicas diferentes dos outros doentes internados com o mesmo diagnóstico e em circunstâncias clínicas semelhantes, beneficiando gratuitamente de todos os recursos disponíveis, indicados e protocolados pelo hospital. Ficou esclarecido que o estudo não implicava custos adicionais para os doentes e famílias que consentissem na adesão. O documento foi assinado em dois exemplares, um dos quais foi entregue ao doente ou seu familiar responsável. Nos casos em que não foi possível obter uma assinatura porque o doente/familiar não sabia escrever ou estava impossibilitado clinicamente de o fazer, foi aceite a impressão digital do indicador direito.

Os doentes incluídos no estudo não beneficiaram de qualquer pagamento pela participação. Foi garantido o encaminhamento dos doentes com patologia crónica para programas gratuitos de assistência e seguimento médico.

3.2. LOCAL DO ESTUDO

O Hospital Américo Boavida é um hospital angolano, da rede de saúde pública, de âmbito nacional e terciário com 25 especialidades médico/cirúrgicas e 640 camas reais para internamento. Estando sediado em Luanda, capital do País, e num distrito de alta densidade populacional (Rangel), com bairros residenciais habitados na sua grande maioria por população de baixa renda económica, tem uma pressão assistencial muito elevada representada por uma média de 900 doentes atendidos diariamente em ambulatório, sendo 324 destes doentes, em média, atendidos no Serviço de Urgência, entre adultos e crianças. Em 2013 a taxa média de ocupação hospitalar foi de 86%.

Para o Serviço de Urgência são encaminhados doentes com complicações da doença a partir de postos médicos e hospitais periféricos da área de referência e outros doentes que acorrem diretamente pela proximidade física ao hospital do local de residência. Um dos indicadores que mede este fenómeno é a taxa de admissão às salas de observação do Serviço de Urgência (onde estão disponíveis mais 140 macas), cerca de 23% do número de doentes observados por dia.

Para absorver este número diário de doentes admitidos no Serviço de Urgência se definiu que as camas dos diversos Serviços de internamento são consideradas “camas hospitalares abertas” permitindo, quando existe grande pressão, o internamento de doentes com diagnósticos médicos em qualquer cama dos Serviços desta área e dos doentes com diagnósticos cirúrgicos em qualquer Serviço de especialidade cirúrgica.

Em 2013 o diagnóstico de malária foi registado em 11.455 doentes observados no hospital, cerca de duas vezes mais do que em 2012. Foi a quarta causa de morte hospitalar com 458 óbitos (letalidade específica de 3,9%) e a primeira causa de morte nas crianças com menos de 10 anos de idade.

No Serviço de Urgência foram elaboradas normas de orientação clínica para facilitar a identificação dos doentes com formas graves de malária (anexo 1) e estes doentes foram internados de acordo com as vagas existentes no Serviço de Cuidados Intensivos para vigilância, suporte e tratamento.

3.3 DEFINIÇÃO DOS CRITÉRIOS DE MALÁRIA GRAVE

Para confirmação de doença grave as variáveis foram definidas segundo as orientações da WHO Severe Malaria 2012: malária cerebral (coma não respondível durante pelo menos 30 minutos sem outra causa identificada e / ou convulsões); anemia severa (Hgb menor que 5g/dL), trombocitopenia (número de plaquetas inferior a 100.000/ μ L); insuficiência renal aguda (creatinina maior que 3 mg/dL ou elevação para o dobro do valor inicial e ou débito urinário menor que 400 mL/ dia em adultos); distress respiratório (hipoxemia aguda obtida pela fração entre a pressão parcial de oxigénio medida no sangue arterial e a fração de oxigénio do ar inspirado menor que 300, depois de excluir edema pulmonar cardiogénico; disfunção hepática (ALT elevada pelo menos duas vezes o valor normal em UI/mL) e hiperbilirrubinemia (valor da bilirrubina total maior que 2,5 mg/dL); hiponantremia (Na^+ menor que 125 mEq/dL); acidemia (pH menor que 7.25) e hipoglicemia (glicemia sérica menor que 40 mg/dL).

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS LABORATORIAIS CLÍNICOS

As análises clínicas dos doentes do estudo foram realizadas no Laboratório Central do Hospital Américo Boavida, a partir das amostras de sangue total colhidas no dia da admissão ao hospital, e diariamente em todos os outros dias subsequentes de internamento. As colheitas de sangue para as amostras foram obtidas por punção venosa das veias do sangrandouro (antebraço), punções realizadas por enfermeiro do SCI. As amostras foram transportadas em tubos de vácuo adequados para o processamento dos exames de acordo com as normas preconizadas pelos diferentes fabricantes dos equipamentos.

Para a obtenção do hemograma foi utilizado o analisador de hematologia Sysmex, modelo XT-1800i. Os parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, bilirrubina total, direta e indireta e as transaminases) foram obtidos no analisador ELITECH, modelo EL 200. Os exames serológicos foram processados no equipamento Mini Vidas®, da Biomérieux. A citometria de fluxo para o doseamento das células TCD4 e TCD8 foi feita no equipamento BD, modelo FACS count. As culturas microbiológicas foram processadas no Batec® 9.240 e os testes de sensibilidade foram efetuados pelo método automatizado com a utilização do Vitek 2®.

Para a obtenção dos parâmetros da gasimetria e ionograma foi utilizado um analisador Gem modelo 3000, disponível no SCI.

O Laboratório está num processo de controlo de qualidade de acordo com as normas ISO 9001.

3.5 DIAGNÓSTICO DAS DISFUNÇÕES DE ÓRGÃOS E PROBABILIDADE DE MORTE NO CONTEXTO DA MALÁRIA GRAVE

O diagnóstico das disfunções de órgãos foi estabelecido com base nos resultados analíticos obtidos no Laboratório Central do hospital e as variáveis fisiológicas registadas diariamente pela equipa médica no SCI. As disfunções orgânicas foram quantificadas todos os dias para cada um dos doentes do estudo utilizando o SOFA *score* e a probabilidade de morte foi obtida com a calculadora oficial acessível em: <http://clincalc.com/icumortality/sofa.aspx>.

Para a estratificação das falências de órgãos foi considerado o pior valor laboratorial observado diariamente nos três primeiros dias de internamento no SCI. O SOFA *score* utiliza a avaliação de seis sistemas orgânicos com as seguintes variáveis fisiológicas e laboratoriais, conforme se apresenta na tabela 4.

Tabela 4. SOFA *score* acessível em <http://clincalc.com/icumortality/sofa.aspx>

	0	1	2	3	4
Respiratório: PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	>400	<400	<300	<200	<100
Renal: Creatinina (mg/dL) ou débito urinário	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 ou <500 mL/dia	5,0 ou >=200 mL/dia
Hepático: Bilirrubina total (mg/dL)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>=12,0
Cardiovascular: Hipotensão	Sem hipotensão	MAP ≤70 mmHg	Dopamina 5µg ou Dobutamina (sem dose)* ¹	Dopamina >5µg ou noradrenalina ≤0,1*	Dopamina >15µg ou noradrenalina >0,1 a ≤20*
Hematológico: Contagem de plaquetas (x µL)	≥150	≤150	≤100	≤50	≤20
Neurológico: Escala de Glasgow	≥15	13-14	12-120	¹ 9-6	<6

A pontuação é obtida diariamente por sistema orgânico (de 0 a 4 pontos por cada sistema). O somatório dos seis sistemas obtidos diariamente corresponde a uma probabilidade de morte validada em vários estudos randomizados efetuados em Unidades de Cuidados Intensivos. Pontuações superiores a 10 traduzem-se em probabilidades de morte superiores a 40% e a soma de 15 pontos corresponde a mortalidade esperada superior a 80% (tabela 5).

¹ *Os cardiotônicos administrados durante pelo menos 1 hora (doses em µg/Kg/min)

Tabela 5. Pontuação SOFA e probabilidade de morte acessível em <http://clincalc.com/icumortality/sofa.aspx>

Máximo SOFA score (pontos)	Mortalidade
0 a 6	<0 %
7 a 9	15 a 20 %
10 a 12	40 a 50 %
13 a 14	50 -60%
15	>80 %
15 a 24	>90%

Neste estudo, a identificação precoce da falência renal foi feita com base na classificação de AKI, que está resumida na tabela 6:

Tabela 6. Adaptado de Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A; *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. Critical Care. 2007;11(2): R31

Classificação de RIFLE	Critério TFG ²	Critério diurese
Estádio 1	Aumento da SCr ³ x 1,5	ou > 0,3mg/dL Diurese <0,5mL/Kg/h em 6h
Estádio 2	Aumento da SCr x 2	Diurese <0,5mL/Kg/h em 12h
Estádio 3	Aumento da SCr x 3	ou SCr > 4mg/dL (com aumento agudo > 0,5mg/dl) Diurese <0,3mL/Kg/h em 24h ou anúria por 12h

² TFG – Taxa de filtração glomerular

³ SCr – creatinina sérica

Doentes no estágio 2 (*Injury*) iniciaram precocemente hemodiálise e também os doentes com acidose metabólica severa e /ou outras alterações graves metabólicas e hidroelectrolíticas.

3.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA POR MICROSCOPIA ÓTICA

A parasitémia foi determinada por microscopia ótica em gota espessa, corada com *Giemsa*, pela contagem do número de formas parasitadas por microlitro de sangue (μL), numa lâmina. Fez-se em relação a um número padrão de leucócitos (8.000), utilizando o seguinte procedimento: se, após a contagem de 200 leucócitos fossem identificados 10 ou mais parasitas, registou-se na fórmula o número de parasitas/200 leucócitos; se após a contagem de 200 leucócitos, fossem identificados 9 ou menos parasitas a contagem continuava até atingir os 500 leucócitos e registou-se na fórmula o número de parasitas contados por 500 leucócitos. Em cada caso o número de parasitas contado em relação aos leucócitos foi convertida em parasitas/ μL através da seguinte fórmula matemática:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitas por } \mu\text{L} = \text{N}^\circ \text{ de parasitas} \times 8.000 / \text{N}^\circ \text{ de leucócitos}$$

3.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA POR TRD

Os testes rápidos que foram utilizados para confirmação da infecção e da espécie foram produzidos pela Boson Biotech (90-94 Tianfeng Road, Jimei North Industrial Park, Xiamen, Fujian, 361021, P. R. China). O teste é *dual* para o diagnóstico da infecção para duas espécies de *Plasmodium*: *falciparum* e *malariae*. A determinação rápida qualitativa de antígenos do *P. falciparum* é efectuada pela detecção da proteína específica rica em histidina-2 (*Pf* HRP-2) e para o *P. malariae* pela detecção de uma enzima lactato desidrogenase (*PLdh*) no sangue total humano. A reacção baseia-se num ensaio imunocromatográfico com anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos dos parasitas impregnados numa tira de teste como duas linhas separadas. São utilizados

5 microlitros de sangue total do doente e adicionadas 2 gotas da solução comercial “*buffer*” sendo a leitura do resultado válida ao fim de 10 minutos. O teste só é validado quando a barra do controlo é perfeitamente visível após a colocação do sangue total e da solução “*buffer*”.

3.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As amostras de sangue de cada um dos doentes foram impregnadas em papel de filtro (WhatmanTM, GE Healthcare – UK). DNA genômico de cada amostra de sangue foi purificado através do kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen – EUA). A seguir, as amostras foram submetidas a um ensaio de *nested PCR* (*Polymerase Chain Reaction*), de acordo com as condições de reação apresentadas na tabela 7. Na primeira reação de amplificação o par de *primers* utilizados apresentam especificidade para a sequência ribossomal específica para o género *Plasmodium spp*. Na segunda reação de PCR, a utilizar uma alíquota da reação anterior como *template*, foram utilizados quatro pares de *primers*, específicos para uma das quatro espécies de *Plasmodium spp*. As sequências de cada *primers* e os produtos de amplificação de cada reação são apresentados na tabela 8 (Doolan, 2002; Snounou *et al.*, 1993).

A mistura da reação de PCR foi submetida ao termociclador (MJ Mini Gradiente Thermal Cycler, Bio-Rad – EUA), de acordo com as seguintes condições: (1) desnaturação (94°C por dois minutos); (2) etapa adicional de desnaturação (94°C por trinta segundos); (3) *annealing* (55°C por um minuto e trinta segundos); (4) extensão (72°C por dois minutos); (5) final da reação (4°C). Cada ciclo foi repetido 40 vezes. A seguir, a amplificação das sequências de interesse foi analisada em eletroforese em gel de agarose a 2% (v/v).

Tabela 7. Condições de reação da *nested* PCR utilizada para amplificar sequências específicas de *Plasmodium spp* em amostras de sangue

Constituintes (Bioline – UK)	Concentração	Volumes (µL)
Amostra de DNA genómico	-	3,0
<i>NH₄ buffer</i>	10x	5,0
Cloreto de Magnésio	50 mM	3,0
Mistura de dNTPs	100 mM	1,0
<i>Primers (sense e anti-sense)</i>	100 pmol/µL	1,0 cada
Enzima Taq polimerase	5 u/ µL	0,5
Água	q.b.p	50,0

Para a extração do DNA foi utilizado um *Kit* comercial da BIOLINE (Blood PCR Kit, BIO-21093). O *Kit* permite fazer as duas fases: a extração do DNA das amostras de sangue total e a amplificação por PCR. Possui os seguintes componentes: solução de tampão *buffer*, solução de neutralização, solução sanguínea de mistura PCR e solução de 50 mM MgCl₂. No entanto para este estudo foi processada apenas a primeira fase do teste.

Para a extração do DNA os tubos foram preparados com 10 µL de sangue das amostras dos doentes + 20 µL de Tplyse e após homogenização foram adicionados 180 µL de TP neutralizante. Foi adicionado um tubo para controlo negativo. Os tubos foram sujeitos ao programa do termociclador durante cerca de 3 horas.

Tabela 8. Sequências nucleotídicas (*primers*) utilizadas na *nested* PCR específicas para as espécies de *Plasmodium spp.* Os *primers* foram sintetizados pela companhia Thermo Scientific – Alemanha. Pb: pares de bases.

Sequências dos <i>primers</i> *	Especificidade	Produto amplificado
5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3' 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'	<i>Plasmodium spp</i>	1.200 pb
5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3' 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'	<i>P. falciparum</i>	205 pb
5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3' 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'	<i>P. malariae</i>	144 pb
5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'	<i>P. vivax</i>	120 pb
5'-ATCTCTTTTGTATTTTTTAGTATTGGAGA-3' 5'-GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG-3'	<i>P. ovale</i>	800

3.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA POR ELISA

3.9.1. Determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.*

A detecção quantitativa de anticorpos totais anti-*plasmodium* foi feita por ensaio imunoenzimático (ELISA). O método baseia-se na ligação de anticorpos anti-*Plasmodium* presentes em amostras de soros, com antígenos que estão adsorvidos à placa (variam consoante o *Kit* em questão). O complexo que contém o anticorpo é visualizado pelo acoplamento da enzima ao anticorpo. A adição de substrato ao complexo enzima-anticorpo-antígeno resulta num produto colorido. Permite testar grande número de amostras e é mais reprodutivo e mais fácil de ser automatizado.

Para o doseamento dos anticorpos totais anti-*Plasmodium spp* utilizou-se um Kit de ELISA comercial (Malaria EIA Test Kits) produzido pela Bio-Rad. O fabricante utiliza quatro antígenos recombinantes para produzir um teste que tem grande especificidade e sensibilidade. Os antígenos detetam IgG, IgM e IgA específicos de quatro espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*), permitindo o teste detetar anticorpos

durante todas as fases da infecção. Os reagentes e o procedimento são fornecidos pelo fabricante.

O valor do *Cut-off*, de acordo com o fabricante foi calculado da seguinte forma:

$$\frac{\text{Controlo negativo 1} + \text{CN 2} + \text{CN3}}{3} + 0,100$$

3

O critério de validação do Malaria EIA Test Kits é o seguinte: a absorvância de cada controlo negativo deverá ser igual ou inferior a 0,080 ABS. Se algum dos controlos estiver acima deste valor, a leitura deve ser ignorada e o *Cut-off* deve ser calculado com base nos dois restantes valores de controlos negativos. A absorvância de cada controlo positivo deverá ser maior ou igual a 1,000 ABS. Amostras com valores de absorvância menor que o valor do *Cut-off* são consideradas negativas. Amostras cujo valor de absorvância só seja de 10% abaixo do valor do *Cut-off* devem ser interpretadas com cuidado. O procedimento foi feito em duplicado para aumentar a exatidão do método. Amostras com valores superiores ao *Cut-off* são consideradas positivas pelo Malaria EIA Test Kit.

A especificidade deste teste para *P. falciparum* é de 96,21% e a sensibilidade é de 92,5%.

3.9.2. Determinação de subclasses e subtipos de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*

Determinou-se a presença das subclasses (IgG e IgM) e subtipos (IgG1, IgG3, IgG4) de anticorpos específicos para *P. falciparum* nas amostras de sangue total dos pacientes com malária de acordo com o protocolo estabelecido por Medina, 2011. Resumidamente, extrato proteico total de *P. falciparum* 3D7 (com 23,3 Mb de tamanho, cariótipo de 14 cromossomas e cerca de 5,300 genes), gentilmente oferecido pela Doutora Fátima Nogueira (Unidade de Parasitologia do IHMT/UNL), foi adsorvido (200 ng/poço) em placas de ELISA (Nunc – Dinamarca) em tampão bicarbonato 0,1M pH 8,5. Cada poço levou de volume 100 µL do extrato proteico na concentração final de 200 ng/poço. Incubou-se a placa com antigénio, durante a noite a 4°C. Após incubação,

lavou-se a placa três vezes, com 200 µL de tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) por poço, para a remoção do excesso de antígeno que não foi adsorvido à placa. De seguida, incubou-se a placa com 200 µL/poço de tampão de bloqueio (PBS-BSA 1%), durante uma hora à temperatura ambiente e com agitação orbital, com o objetivo de reduzir a ocorrência de ligações inespecíficas. Lavou-se a placa três vezes com 200 µL/poço, com tampão de lavagem. De seguida, incubou-se a placa com 100 µL/poço das diferentes concentrações das amostras de sangue dos doentes, diluídas em tampão de anticorpo (PBS-BSA 0,1%-Tween 0,05%), em duplicado, e em diluições seriadas (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400), durante uma hora à temperatura ambiente, com agitação orbital. Esta incubação permitiu a ligação do anticorpo, presente na amostra, ao antígeno adsorvido à placa e as diluições seriadas permitiram identificar a melhor diluição das amostras de sangue a utilizar neste estudo. Após o período de incubação com as amostras de soros, a placa foi lavada cinco vezes com 200 µL de tampão de lavagem, com o objetivo de remover o excesso de anticorpos que não ficou ligado ao antígeno adsorvido à placa. Para a deteção do anticorpo anti-*P. falciparum* as placas foram incubadas com 100 µL/poço de diferentes anticorpos: anti-IgG conjugado com peroxidase (HRP) (1:4000) (AbD Serotec, UK), anti-IgM conjugado com fosfatase alcalina (AP) (1:4000) (Calbiochem – UK), anti-IgG1 conjugado com biotina (1:4000) (Sigma – EUA), anti-IgG3 conjugado com biotina (1:4000) (Sigma – EUA), anti-IgG4 conjugado com biotina (1:4000) (Sigma – EUA); durante 1h à temperatura ambiente e com agitação orbital. De seguida, fizeram-se cinco lavagens, cada uma com 200 µL/poço de tampão de lavagem, para remover o excesso de anticorpo conjugado que não ficou ligado ao anticorpo primário. Para revelar a presença do conjugado, antígeno-anticorpo primário-anticorpo secundário, para IgG incubou-se a placa com 100 µL/poço de solução de substrato (10 mL de tampão de citrato com 10 mg de OPD e 10 µL de peróxido de hidrogénio 30% v/v) durante 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A enzima HRP na presença de peróxido de hidrogénio catalisa a reação da *ortho-phenylenediamine* (OPD), produzindo uma substância cromófora que absorve a 490 nm. Para parar a reação, utilizou-se o ácido sulfúrico 4N, que vai inibir a atividade da enzima através da desnaturação proteica pela variação do pH. Para revelar a presença de IgM incubou-se a placa com 100 µL/poço de solução de substrato p-nitrofenil-fosfatase na concentração de 1 µg/mL diluído em tampão dietanolamina 10%, produzindo uma

substância cromófora que absorve a 415 nm. Para a reação com biotina, o procedimento foi desenvolvido de acordo com as informações do fabricante (Sigma – EUA). Os resultados de reatividade foram analisados em função da densidade ótica obtida por cada amostra e em cada sistema colorimétrico.

Definiu-se o valor do *Cut-off* como a média de OD de cada uma das 101 amostras a dividir pelo valor da média do controlo negativo processadas com a diluição de 1:100 para anticorpos anti-IgG e anti-IgM e com a diluição de 1:50 para os anticorpos anti-IgG3 e IgG4 e de 1:25 para os anticorpos anti-IgG1, em virtude de se ter verificado que na concentração anterior se obteve valores muito baixos para a IgG1

A escolha da diluição baseou-se no facto de se verificar que a partir deste valor de diluição os soros negativos para malária começaram a apresentar valores de OD constantes ou muito próximos, o que permite minimizar a ocorrência de ligações inespecíficas.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados recolhidos dos doentes estudados foram inicialmente organizados em tabelas do programa MS-Excel, suportado no sistema operativo Microsoft Windows 8. Utilizou-se o programa estatístico IBM-SPSS versão 21, para análise estatística das variáveis clinicamente mais interessantes, tomando por base $\alpha=0,05$; nível confiança 95%. Para cada uma das variáveis registadas no presente estudo foi feita uma exaustiva Análise Exploratória de Dados (AED), no sentido de apurar a real distribuição estatística dos dados observados, variável a variável. Em particular, e para as variáveis contínuas, foi investigada a gaussianidade da distribuição estatística dos dados, e o menor ou maior grau de afastamento da situação de normalidade. Para tanto, estudaram-se as diferenças entre média, mediana e moda, e foram atentamente estudados os respectivos histogramas e gráficos de caixa-e-bigodes para cada variável registada. Foi ainda feito um esforço para rastrear à partida todos os valores extremos (*outliers*) que pudessem comprometer a possibilidade de utilização da média aritmética em subsequentes análises estatísticas mais aprofundadas. Para as variáveis discretas foi

estudada a distribuição de frequências para os vários valores que a variável podia admitir, e feita a sua representação gráfica.

Depois de completada a AED passou-se ao estudo de várias variáveis em função da sobrevivência (sobreviventes/falecidos) por análise estatística bivariada. Para as variáveis contínuas foram utilizados, sempre que possível, testes paramétricos, de comparação de valores médios -*One-Way* ANOVA (com os correspondentes testes *Post-Hoc* sempre que necessário: Schéffe, Bonferroni e HSD-Tukey) para estudar as diferenças observadas em cada variável, com base na classificação de sobrevivência (sobreviventes/falecidos). Para as variáveis discretas foram utilizados testes de χ^2 sobre tabelas de contingência, às quais foram feitos os agrupamentos necessários para que cada célula de frequências esperadas tenha um valor não inferior a 5.

O tratamento estatístico dos resultados progrediu para uma análise multivariada classificatória por *clusters* com base no padrão de disfunções orgânicas para cada caso (presença ou ausência de cada uma das disfunções de órgãos), suspeitando-se que a população em estudo seria heterogênea com várias subpopulações homogêneas. Foi utilizado o algoritmo *Two-Step Cluster Analysis* do IBM SPSS 21. Este algoritmo é especialmente eficaz na revelação de *clusters* contidos num conjunto de dados que possam não ser aparentes numa primeira análise. De acordo com o manual *on line* o algoritmo utilizado tem várias características desejáveis que o distinguem de outras formas tradicionais de Análise de *Clusters*, nomeadamente: 1) a capacidade de criar *clusters* com base em variáveis discretas e contínuas; 2) a capacidade de seleção automática do número de *clusters*; 3) e a capacidade de analisar conjuntos de dados de grande dimensão de um modo rápido e eficiente. Após a análise classificatória os *clusters* encontrados foram comparados entre si (*One-Way* ANOVA e χ^2) no que diz respeito a três variáveis: a sobrevivência, a parasitemia quantitativa e os anticorpos específicos para a espécie.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A malária grave causada por *P. falciparum* continua registada como uma das principais causas de morte por infeção no mundo, particularmente na África subsariana. Em Angola, de acordo com o Relatório Anual de Atividades e Contas do Ministério da Saúde foi a doença mais notificada em 2013 e também a principal causa de morte com uma letalidade de cerca de 4% (MINSa, 2013).

Sendo Angola um país endémico de transmissão estável, na maior parte do ano e na maioria das suas províncias, espera-se que a população adulta residente, de acordo com a literatura, seja portadora de proteção parcial contra as formas graves da doença, proteção adquirida por exposições prévias ao *P. falciparum*. Nas áreas onde a transmissão é estável as formas graves da doença ocorrem geralmente antes dos primeiros cinco anos de idade, sendo menos comuns nas crianças mais velhas e nos adultos, fato imputado à existência desta proteção parcial (Bartoloni & Zammarchi, 2012). A doença grave pode resultar de uma resposta inflamatória exuberante ou ainda de um desequilíbrio entre as citocinas pró e contra inflamatórias.

Assim, considerou-se pertinente estudar os doentes que foram internados consecutivamente com malária grave numa UCI de Luanda, localizada num hospital nacional da rede de saúde pública de Angola (onde são internados doentes com dez ou mais anos de idade), descrever a amostra no que se refere aos aspetos sociodemográficos, identificar as apresentações clínicas (traduzidas pela presença de disfunção de órgãos), comparar a mortalidade observada com a esperada aplicando *scores* de gravidade e prognóstico simples e, por esta razão, mais utilizados nas Unidades de Cuidados Intensivos dos países em desenvolvimento e estudar a resposta humoral específica dos doentes da presente amostra no que diz respeito à identificação dos anticorpos anti-*P. falciparum*. Procurou-se a existência de associação significativa entre algumas variáveis em estudo e a densidade parasitária e com os grupos de doentes sobreviventes e falecidos do presente estudo.

A descrição dos resultados apresentados a seguir foi organizada da seguinte forma: (1) caracterização sociodemográfica da população em estudo, (2) diagnóstico primário da infeção, (3) estudo clínico laboratorial e das disfunções de órgãos, (4) exames laboratoriais para o diagnóstico específico da infeção por *Plasmodium spp.*

4.1 CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA

No presente estudo utilizou-se uma amostra de 101 doentes que foram internados consecutivamente no Serviço de Cuidados Intensivos do Hospital Américo Boavida em Luanda durante 2 anos, de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- (1) Diagnóstico de infeção por *P. falciparum* (microscopia ótica e/ou teste rápido (TRD) positivos),
- (2) Presença de sintomas e sinais de doença grave (critérios da WHO 2012),
- (3) Presença de duas ou mais disfunções de órgãos à entrada (critérios do SOFA *score*)

Como pode ser visto no gráfico da figura 3, o sexo masculino representou 61,6 % dos doentes estudados (n=101).

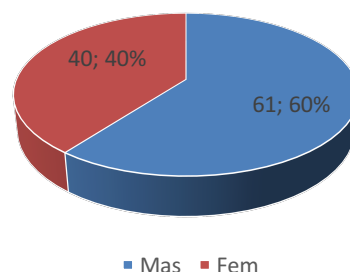


Figura 3. Distribuição da população estudada (n=101) por género.

O predomínio do sexo masculino tem sido verificado indistintamente em outros estudos similares publicados em vários países. Alguns autores referem que em geral o género feminino procura mais frequentemente de forma preventiva os cuidados de saúde não só em decorrência da sua condição de gestante e de maternidade, mas porque em geral são menos otimistas ao avaliar a sensação de bem ou mal-estar, o que parece influir positivamente na situação de doença favorecendo o diagnóstico e tratamento mais

precoce e adequado (Gomes *et al.*, 2007). Por outro lado, os homens estão mais expostos à doença porque de um modo geral mostram menos preocupação com a convivência com determinantes da saúde que favorecem as doenças (Alves *et al.*, 2011). No presente estudo a distribuição pelo género não mostrou ter influência (χ^2 p-value=0,664) na gravidade da doença.

A população estudada apresentou uma média de idade de 21 anos, com desvio padrão de $\pm 10,72$ e mediana de 16 anos. A figura 4 mostra a distribuição da população em estudo por grupos etários com uma tendência marcadamente decrescente para as idades mais elevadas. A idade máxima relatada neste estudo foi de 57 anos e a mínima de 10 anos.

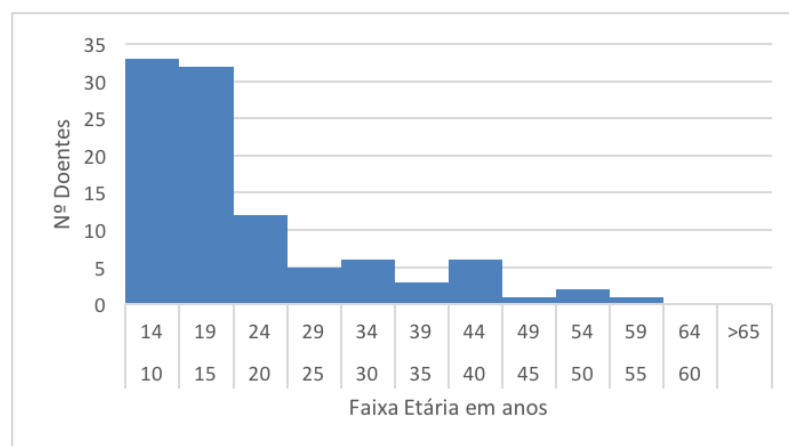


Figura 4. Distribuição dos doentes estudados (n=101) por grupos etários.

Os doentes em estudo foram maioritariamente jovens (moda 14 anos de idade) de acordo com a distribuição etária do País recentemente conhecida de forma oficial e que é similar à maioria dos países em desenvolvimento (Nzatuzola, 2012). Não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre a média de idades dos doentes sobreviventes e da dos falecidos (One Way ANOVA, $p=0,398$). Vários estudos se referem à prevalência de diferentes apresentações de malária grave e à sua relação com a idade, mortalidade e intensidade de transmissão da doença, mas a informação está pouca clarificada. De um modo geral aceita-se que quando a transmissão da infeção é maior mais pessoas estão expostas à infeção, a exposição à infeção ocorre mais cedo, a

imunidade parcial se desenvolve mais cedo e o risco de doença grave se reduz. Malária grave pode ocorrer nas áreas de menor transmissão da doença (Olliaro, 2008). Dondorp e colaboradores em 2008 num estudo multicêntrico realizado em 1 050 doentes asiáticos com malária grave por *P. falciparum* concluiu que a mortalidade varia com a apresentação clínica e com a idade do doente e que a taxa de fatalidade é maior entre os adultos do que entre as crianças. Os grupos extremos (crianças com menos de 2 anos e adultos com mais de 50 anos) parecem ser os mais vulneráveis. Kandanga e colaboradores verificou em 72 doentes com malária grave por *P. falciparum*, que as mulheres com mais de 40 anos têm maior mortalidade do que mulheres mais novas e do que os homens da mesma faixa etária (Khadanga *et al.*, 2014). Foram excluídos deste estudo as mulheres grávidas e crianças com menos que 15 anos de idade. O coma e a acidose metabólica sobressaiem como significativos fatores de risco para a morte em ambos, crianças e adultos (Dondorp *et al.*, 2008).

Adicionalmente, Phillips e colaboradores num estudo sobre fatores de risco para a malária grave em 468 doentes com infecção por *P. falciparum* verificou que os doentes com malária grave eram mais velhos e que um aumento na idade de 10 anos correspondia a um aumento de 30% na gravidade da doença (Phillips *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos de doentes graves internados nas UCIs têm mostrado correlação entre a idade e a probabilidade de morte. Cabré e colaboradores (2005) num estudo observacional e prospetivo randomizado efetuado em 79 UCIs refere que a idade em doentes avaliados pelo SOFA *score*, nomeadamente maiores que 60 anos, com valores mantidos 5 dias seguidos de 9 pontos ou mais se correlacionou com a mortalidade em 100%.

Considerando a naturalidade e a residência, recolhidas na ficha de recolha de dados preenchido à admissão, achamos pertinente subdividir os doentes em estudo em três grupos conforme a seguir se descreve: Grupo 1 - todos os doentes que eram residentes em áreas endémicas para a malária sem interrupção de residência num período maior de 6 meses, de forma contínua foram considerados semi-imunes; Grupo 2 - os doentes não residentes em áreas endémicas para a malária e ou que estiveram sem exposição ao parasita num período de tempo superior a seis meses, de forma contínua foram considerados não imunes; Grupo 3 – constituído por alguns doentes identificados na

população em estudo que tiveram positividade para o vírus da imunodeficiência humana (VIH); depois de efetuados doseamentos das células TCD4, todos os valores estavam muito inferiores ao valor normal (500 células por μL). A infecção pelo VIH afeta diretamente os linfócitos (células TCD4) e, em teoria, consequentemente, a produção de anticorpos, razão porque se investigou o comportamento da resposta imune humoral neste grupo particular embora apenas representado na nossa amostra por 3 doentes (n=3). Estes doentes constituíram um grupo que denominamos como situações especiais.

A figura 5 mostra que os doentes semi-imunes representaram 87% da população estudada (n=101).

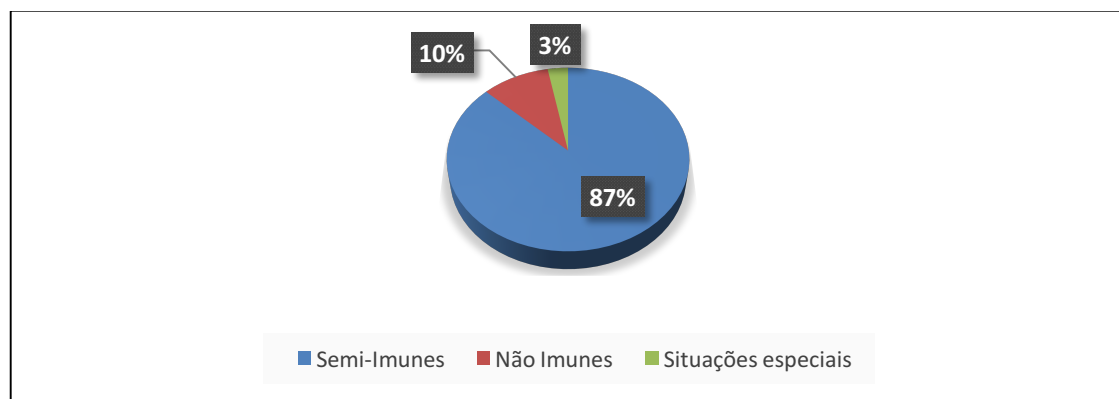


Figura 5. Distribuição dos doentes estudados (n=101) pelo local e tempo de residência antes do internamento.

O presente estudo só incluiu doentes com mais de 9 anos de idade e a maioria dos doentes era autótone e residente em África de forma consecutiva pelo menos nos seis meses anteriores ao internamento. Recentes dados mostram que a proteção contra a doença grave (não cerebral) se adquire após o primeiro ou o segundo episódio de infecção por *P. falciparum* e o grau de imunidade contra a malária grave após a primeira infecção parece aumentar com a endemicidade (Gupta *et al.*, 1999). Os doentes “Não imunes” constituíram apenas 10% da amostra. No presente estudo não encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos de doentes em função da parasitemia periférica e da gravidade da doença (χ^2 p-value=0,729). Marks e colaboradores também não encontraram correlação entre a gravidade da malária por *P.*

falciparum e o fato dos doentes serem pretensamente imunes ou não, considerando critérios de naturalidade e residência, num estudo realizado com 124 doentes com malária importada em Inglaterra (Marks *et al.*, 2013).

No presente estudo (n=101) a maior parte dos doentes (72,2%) não tinha registo de patologia associada na ficha de recolha de dados à admissão. As patologias listadas na tabela 9 foram registadas apenas em 24 doentes em estudo.

Tabela 9. Distribuição dos doentes estudados segundo co-morbilidade registada (n=101).

Patologia Associada	Número de doentes	%
Pneumonia aspirativa+ Broncopneumonia	5	4,9
Diabetes Mellitus + HTA	3	2,9
Sida	2	1,9
Sepses Ginecológica	2	1,9
Drepanocitose SS	2	1,9
Tuberculose Pulmonar	1	0,9
Tétano	1	0,9
Pielonefrite crónica	1	0,9
Peritonite tuberculosa	1	0,9
Leptospirose	1	0,9
Meningite	1	0,9
Epilepsia	1	0,9
Sida + tuberculose pulmonar	1	0,9
Alcoolismo	2	1,9
Sem informação	4	3,9
Sem patologia associada	73	72,2
Total	101	100

A presença de co-morbilidade esteve de acordo com o esperado, considerando que a amostra tem doentes maioritariamente jovens. Não se encontrou associação entre a presença de doença crónica e a evolução clínica da infeção por malária (χ^2 p=0,14), contrariamente a outros estudos (Bruneel *et al.*, 1997, Marks *et al.*, 2013), na maioria deles referindo-se a doentes com malária importada e com média de idades mais elevada.

A tabela 10 apresenta o resumo dos principais testes estatísticos utilizados entre as variáveis sociodemográficas descritas e as duas populações, a dos doentes sobreviventes e a dos falecidos. Os resultados apresentados abaixo mostram que não existe diferença

estatisticamente significativa entre sobreviventes e não sobreviventes, para as variáveis na primeira coluna da tabela 10.

Tabela 10. Comparação das variáveis sociodemográficas entre os doentes sobreviventes e não sobreviventes de presente estudo (n=101).

VARIÁVEIS	SOBREVIVENTES (nº 84)	FALECIDOS (nº 17)	p	Teste
Sexo (F/M)	33 F /51 H	7 F /10 H	0,884	Chi-Square
Média Idade	20,23 anos ±10,20	22,64 anos ±13,17	0,398	One-Way ANOVA
Nacionais Expatriados	82 Nacionais/ 2 Expatriados	15 Nacionais / 2 Expatriados	0,07	Chi-Square
Semimunes Não imunes	72 Semi /9 Não imunes	15 Semi / 2 Não Imunes	0,62	Chi-Square
Co-morbilidade	19	7	0,14	Chi-Square

4.2 DIAGNÓSTICO PRIMÁRIO DA INFECÇÃO

O diagnóstico laboratorial da infeção por *Plasmodium spp* foi inicialmente feito através do método direto da pesquisa do parasita circulante por microscopia ótica em gota espessa, técnica efetuada no primeiro dia de internamento em 100 dos 101 doentes internados. A maior parte dos doentes apresentaram amostras de sangue com número de parasitas inferior a 50.000 por μL (57,4%) conforme se apresenta na tabela 11.

Tabela 11. Distribuição dos doentes estudados (n=101) pela densidade parasitária na gota espessa.

Densidade Parasitária	Número de doentes	%
Negativa	8	7,9
$\leq 50.000/\mu\text{L}$	58	57,4
$> 50.000 \leq 100.000 /\mu\text{L}$	14	13,8
$> 100.000 \leq 150.000 /\mu\text{L}$	1	0,9
$> 150.000 \leq 200.000 /\mu\text{L}$	1	0,9
$>200.000 \leq 250.000 /\mu\text{L}$	18	17,8
Sem informação	1	0,9
TOTAL	101	100

Utilizamos os valores médios da densidade parasitária obtida pela gota espessa, realizada à admissão, para estudar a correlação entre os dois grupos de doentes, sobreviventes e falecidos. Esta análise utilizando o teste One-Way ANOVA demonstrou

não existir uma diferença estatisticamente significativa da densidade parasitária com os dois grupos ($p=0,923$), conforme apresentado na tabela 12.

Tabela 12. Relação estatística entre o grupo dos doentes sobreviventes e o grupo dos falecidos em relação à parasitémia periférica média.

MICROSCOPIA	SOBREVIVENTES (n=84)	FALECIDOS (n=17)	<i>p</i>	Teste
Parasitémia média	69.313 por μL (± 93.544)	66.911 por μL (± 88.316)	0,923	One-Way ANOVA

Contrariamente aos resultados obtidos neste estudo, num estudo efetuado na Malásia a densidade parasitária foi muito mais elevada globalmente nos doentes graves e maior nos doentes que morreram (Koh *et al.*, 2004). Também Phillips e colaboradores observaram numa amostra de 482 doentes com malária por *P. falciparum*, em que parasitemias maiores que 100.000 por μL (cerca de 2%) estiveram relacionadas com maior gravidade da doença e uma análise multivariada mostrou que a gravidade da doença era cinco vezes maior em parasitemias superiores a 2% (Phillips *et al.*, 2009). No entanto, Achidi e colaboradores também não encontraram correlação da densidade parasitária com as formas graves e as formas não complicadas da malária por *P. falciparum* num estudo efetuado nos Camarões em 2012. Neste estudo que incluiu 908 crianças foi sugerido que a densidade parasitária não é um fator significativo para determinar a gravidade da doença (Achidi *et al.*, 2012). A correlação das apresentações da malária grave por *P. falciparum* com maior grau de sequestração do parasita nos capilares e vénulas dos diversos órgãos, formando rosetas, pode explicar a baixa parasitémia periférica, particularmente nas formas de malária cerebral (Carlson *et al.*, 1994, Seydel *et al.*, 2006).

Utilizaram-se também testes rápidos (TRD) em simultâneo com a gota espessa para o diagnóstico da infeção à admissão. Os testes rápidos realizados neste estudo confirmaram a infeção por *P. falciparum* em 86 doentes (85,1% dos doentes em estudo). Registou-se infeção mista por *P. falciparum* e *P. malariae* em 4 amostras destes doentes. Foram registados 15 TRD falsos negativos, mas todos os testes TRDs

foram positivos e validaram o diagnóstico da infecção por *P. falciparum* nos doentes com a microscopia ótica negativa ou não realizada (n=8).

A tabela 13 resume a situação dos doentes com TRDs negativos (n=15), o destino final, tempo de internamento e patologia associada. Apenas três (n=3) doentes tinham registo de patologia crónica associada. Um destes doentes era homozigótico para a HbS (resultados não apresentados). Registou-se dois óbitos nos doentes em estudo com TRD negativo. Os dois doentes falecidos não tinham registo de patologia associada e desenvolveram 4 disfunções de órgãos simultâneas tendo falecido ambos nas primeiras 24 horas de internamento.

A sensibilidade do teste rápido de diagnóstico que foi utilizado para a pesquisa de antígenos dos *P. falciparum* e *P. malariae* sugeria um número de resultados positivos que não se confirmou. Numa meta-análise realizada sobre 74 artigos científicos publicados sobre os testes rápidos comercializados até 2011 para a deteção das infeções por *Plasmodium spp* e publicada pela *Cochrane Collaboration* (Abba *et al.*, 2011) a sensibilidade dos testes foi em média superior a 96%. No relatório efetuado pelo Programa Global da Malária (WHO, 2011) foram validados os testes específicos para a deteção do antígeno PfPM1 e de um modo geral estes testes têm uma sensibilidade acima de 95%, embora com especificidade ligeiramente inferior. Nos testes rápidos com resultados “falsos negativos” registamos 5 amostras com alta parasitémia na microscopia ótica (maior ou igual a 250.000 por μL). Foi sugerido que a sensibilidade dos testes pode paradoxalmente diminuir nas densidades parasitárias muito altas (mais frequentemente na malária grave) pela competição que pode existir nos locais de captura dos TRDs (Rey-burn *et al.*, 2007). Na Tanzânia em 2 139 crianças com diagnóstico de malária por *P. falciparum*, nos 557 testes discordantes entre TRD e gota espessa foi encontrada a taxa de 10% de falsos negativos (TRD negativo e gota espessa positiva), e nestes, 14,3% apresentavam parasitémias superiores a 50.000 por μL (Birku *et al.*, 1999).

Tabela 13. Relação dos doentes com TRD falso negativo com a presença de patologia crónica e a evolução do internamento.

ID	Disfunções de órgãos	Destino	Tempo de internamento (dias)	Patologia associada
A8	Hematológica, neurológica, hepática e renal	Alta	3	Sem patologia associada
A16	Hematológica, neurológica e hepática	Alta	12	Sem patologia associada
A24	Hematológica, neurológica, hepática e renal	Falecido	1	Sem patologia associada
A36	Hematológica, neurológica, hepática e cardiovascular	Falecido	1	Sem patologia associada
A39	Hematológica e neurológica	Alta	3	Hta
A41	Hematológica e neurológica	Alta	4	Epilepsia
A46	Hematológica e neurológica	Alta	7	Sem patologia associada
A59	Neurológica	Alta	4	Pielonefrite crónica
A61	Hematológica e neurológica	Alta	3	Sem patologia associada
A71	Hematológica e hepática	Alta	8	Sem patologia associada
A77	Hematológica, hepática e renal	Alta	8	Drepanocitose SS
A90	Hematológica, hepática e neurológica	Alta	5	Sem patologia associada
A93	Hematológica renal e neurológica	Alta	7	Sem patologia associada
A97	Hematológica e neurológica	Alta	7	Sem patologia associada
A98	Hematológica, hepática e neurológica	Alta	18	Sem patologia associada

4.3 ESTUDO CLÍNICO LABORATORIAL E DAS DISFUNÇÕES DE ÓRGÃOS

Nos doentes em estudo (n=101), fizeram-se colheitas de sangue venoso no dia da admissão, e nos dois dias subsequentes de internamento, para realização de exames hematológicos, bioquímicos, gasimétricos e outros de acordo com o protocolo existente no Serviço de Cuidados Intensivos do Hospital Américo Boavida (Luanda-Angola) mais do que uma vez por dia sempre que a evolução do quadro clínico o justificasse.

Estes resultados analíticos permitiram simultaneamente estratificar as disfunções orgânicas e em função disso avaliar a evolução clínica de acordo com o SOFA *score* e o MAS *score*.

O valor médio da hemoglobina dos doentes em estudo (n=101) foi 8,2g/dL \pm 2,7 (valor mínimo 3,1 e máximo 15,5g/dL). A tabela 14 mostra que a maioria dos doentes (91%) apresentou anemia (Hb <12g/dL). Em 15,8%, o valor de hemoglobina foi inferior ou igual a 5g/dL (anemia severa) com necessidade de transfusão imediata. Os doentes com valores até 8 g/dL, representando quase metade dos doentes em estudo (47,4%), também fizeram transfusão total de glóbulos durante o internamento, de acordo com as normas de orientação clínica aprovadas no SCI e em grande parte de outras UCIs (Bashawri *et al.*, 2002).

Tabela 14. Distribuição do valor da hemoglobina nos doentes estudados (n=101).

Valor da hemoglobina (g/dL)	Número de doentes	%
≤ 5	16	15,8
$> 5 \leq 8$	32	31,6
$> 8 \leq 12$	44	43,5
> 12	9	8,9
Total	101	100

O doseamento do número das plaquetas dos doentes estudados (n=101) está resumido na tabela 15. O valor médio foi 83.484 por μ L \pm 93.368 (valor mínimo 8.000 e máximo 500.000 por μ L). Aproximadamente 50% dos doentes apresentou valores de plaquetas inferiores a 50.000 por μ L. Apenas cinco doentes do estudo apresentaram valores normais (entre 250.000 e 350.000 por μ L).

Tabela 15. Distribuição dos valores das plaquetas na população estudada (n=101).

Número de plaquetas/ μ L	Número de doentes	%
$\leq 50,000$	51	50,4
$> 50,000 \leq 100,000$	23	22,7
$> 100,000 \leq 150,000$	11	10,8
$> 150,000 \leq 200,000$	4	3,9
$> 200,000 \leq 250,000$	2	1,9
$> 250,000 \leq 350,000$	5	4,9
$> 350,000$	3	2,9
Sem informação	2	1,9
Total	101	100

A tabela 16 apresenta a distribuição dos valores da ureia obtidos nos doentes em estudo. Dois terços dos doentes (75,2%) apresentaram valores de ureia alterados (valor normal até 40 mg por dL). O valor médio foi calculado em 117,04 mg por dL \pm 104,61 (valor mínimo 7 e máximo 566 mg/dL).

Tabela 16. Distribuição dos valores da ureia nos doentes estudados (n=101).

Valor da ureia (mg/dL)	Número de doentes	%
≤ 40	22	21,7
$> 40 \leq 100$	36	35,6
$> 100 \leq 150$	11	10,8
$> 150 \leq 200$	16	15,8
$> 200 \leq 250$	5	4,9
> 250	10	9,9
Sem informação	1	0,9
Total	101	100

A disfunção renal no SOFA *score* é avaliada com o doseamento da creatinina. A tabela 17 mostra que os valores da creatinina obtidos nos doentes em estudo (n=101) estiveram dentro dos parâmetros normais apenas em 32,6% dos casos (valor normal até 1,2 mg por dL). O valor médio da creatinina nos doentes estudados foi 2,87 mg/dL \pm 2,60 (valor mínimo 0,20 e máximo 15,10 mg/dL).

Tabela 17. Distribuição dos valores da creatinina nos doentes em estudo (n=101).

Valor da creatinina /mg/dL)	Número de doentes	%
$< 1,2$	33	32,6
$> 1,2 \leq 2,0$	24	23,7
$> 2,0 \leq 3,5$	14	13,8
$> 3,5 \leq 5,0$	12	11,8
$> 5,0$	18	17,8
Total	101	100

A metodologia para início das técnicas de substituição renal nos doentes críticos (Trang *et al.*, 1992) e o início das técnicas de substituição renal foi decidido nos doentes classificados no estágio 2 (lesão renal = *injury*). Existe evidência científica de melhores resultados na Neste estudo, por razões éticas, foi utilizado para o diagnóstico de

insuficiência renal aguda a classificação de AKIN recuperação da função renal quando se utiliza esta.

A tabela 18 apresenta os doseamentos dos valores da alanina amino transferase (ALT) que estiveram alterados em 70,2 % dos doentes em estudo (n=101) e do aspartato amino transferase (AST), estes elevados em 42,5% dos casos. Os valores normais no laboratório do hospital estão tabelados até 40 UI e 46 UI, respetivamente. Os valores médios das transaminases (ALT e AST) foram calculados para a ALT em 137 UI \pm 142,5 (valor mínimo 10 e máximo 753 UI) e para a AST 82 UI \pm 96,06 (valor mínimo 10 e máximo 616 UI). A bilirrubina total esteve alterada em cerca de dois terços dos doentes (76,2 %) estudados (n=101) (valor normal até 1 mg por dL). O valor médio foi calculado em 5,32 mg/dL \pm 7,14 (valor mínimo 0,40 e máximo 47,70 mg/dL).

Tabela 18. Distribuição dos valores das aminotransferases e bilirrubina total nos doentes em estudo (n=101).

Parâmetro	Normais	%	Elevados	%	Sem informação	%
ALT	13	12,8	71	70,2	17	16,8
AST	41	40,5	43	42,5	17	16,8
Bilirrubina Total	14	10,8	77	76,2	10	9,9

A tabela 19 resume a análise estatística efetuada utilizando a média dos valores obtidos nos resultados analíticos atrás apresentados nas sub-populações dos doentes sobreviventes e falecidos. Todos os parâmetros laboratoriais referidos na tabela integram a pontuação do SOFA *score*.

De um modo geral foram observadas diferenças significativas entre os valores médios nos grupos de doentes sobreviventes e falecidos, com valores mais gravosos no grupo dos falecidos, tal como relatam outros trabalhos similares (Bruneel *et al.*, 2010, Koh *et al.*, 2004). Apenas os valores das plaquetas e da bilirrubina total não mostraram ter diferença significativa.

Tabela 19. Comparação entre os valores médios laboratoriais obtidos nos doentes sobreviventes e falecidos.

VARIÁVEIS	SOBREVIVENTES (n=84)	FALECIDOS (n=17)	P	Teste
Hemoglobina média	8,3 g/dL ±2,7	6,8 g/dL ±2,31	0,045	One-Way ANOVA
Número médio de plaquetas	89.300/μL ±99.900	55.300/μL ±42.200	0,174	One-Way ANOVA
Média dos valores da ureia	102,61 mg/dL ±91,44	187,47 mg/dL ±136,09	0,002	One-Way ANOVA
Média dos valores da creatinina	2,53 mg/dL ±2,29	4,58 mg/dL ±3,38	0,003	One-Way ANOVA
Média dos valores da bilirrubina total	5,0 7 mg/dL ±7,35	6,59 mg/dL ±6,06	0,424	One-Way ANOVA
Média dos valores da AST	71,8 Unl ±69,3	156,5 Unl ±187,4	0,003	One-Way ANOVA
Média dos valores da ALT	119,9 Unl ±122,0	254,7 Unl ±210,1	0,006	One-Way ANOVA

No presente estudo, a anemia grave foi registada em apenas 15,8% dos doentes, geralmente uma das principais causas de morte das crianças com malária em África (Kai & Roberts, 2008). Por outro lado, a anemia parece não ter o mesmo impacto na mortalidade dos doentes adultos com malária complicada. No presente estudo a hemoglobina média foi a variável menos representativa (*One-Way ANOVA* $p=0,045$) entre as outras variáveis com significância estatística incluídas nesta tabela.

A trombocitopenia, embora não se inclua nos critérios de gravidade da OMS (WHO 2012), esteve presente em 90% dos doentes, achado concordante com artigos de revisão da literatura (Bashawri *et al.*, 2002). A presença de trombocitopenia é um achado frequente na infeção por malária por *P. falciparum* e *P. vivax* (Jadhav *et al.*, 2004). Mas apesar de valores inferiores a 50.000 por μL poderem potenciar a ocorrência de diversos episódios hemorrágicos, estes raramente se observam. Os valores mais baixos de plaquetas ocorrem entre o quinto e o sexto dia e regressam ao normal depois de uma semana após a negatificação da parasitémia (Jadhav *et al.*, 2004). No presente estudo, o

valor médio das plaquetas por μL não mostrou diferença significativa entre os grupos de doentes sobreviventes e falecidos (One-Way ANOVA $p=0,174$). Contudo entre crianças com malária por *P. falciparum* valores inferiores ou iguais a 100.000 por μL podem ser fator preditivo de fatalidade, principalmente em crianças com malária cerebral ou ‘*distress*’ respiratório (Rogier *et al.*, 2004).

O valor elevado da bilirrubina total, com predomínio da fração conjugada, é geralmente o marcador mais correntemente utilizado para a deteção de disfunção hepática. Este marcador é incluído no SOFA *score* para se obter a pontuação relativa a esta disfunção. A média da bilirrubina total esteve elevada neste estudo (5,32 mg por dL \pm 7.14) e a presença de disfunção hepática foi incluída estatisticamente numa análise multivariada como um marcador de mau prognóstico nos doentes do presente estudo como se apresenta mais à frente. Outro estudo similar a classifica também como preditiva para o risco de fatalidade (Das *et al.*, 2007). No entanto, a média da bilirrubina total, por si só, não mostrou diferença estatisticamente significativa, em função da variável sobrevivência (sobreviventes e falecidos, One-Way ANOVA, $p=0,424$).

A tabela 20 resume a percentagem das disfunções de órgãos observadas nos doentes em estudo ($n=101$) com base no SOFA *score*. Os valores laboratoriais e fisiológicos utilizados para o cálculo da pontuação do SOFA corresponderam aos piores resultados registados nos primeiros três dias de internamento hospitalar. A disfunção hematológica, particularmente a presença de trombocitopenia, foi a mais frequente (90%) seguida pela disfunção neurológica (84,1%).

Tabela 20. Distribuição das disfunções de órgãos nos doentes em estudo segundo o SOFA *score*.

Disfunções de órgãos	Nº	%
Hematológica	94	90,0
Neurológica	85	84,1
Hepática	65	64,3
Renal	59	58,4
Respiratória	16	15,8
Cardiovascular	4	3,9

A ocorrência de disfunções simultâneas traduz-se em maior gravidade da doença.

A figura 6 representa o somatório das disfunções simultâneas registadas nos doentes em estudo. Aproximadamente 72% dos doentes apresentou mais do que 2 disfunções de órgãos. Um terço dos doentes (33%) foi registado com 3 disfunções simultâneas e 25% com 4 disfunções.

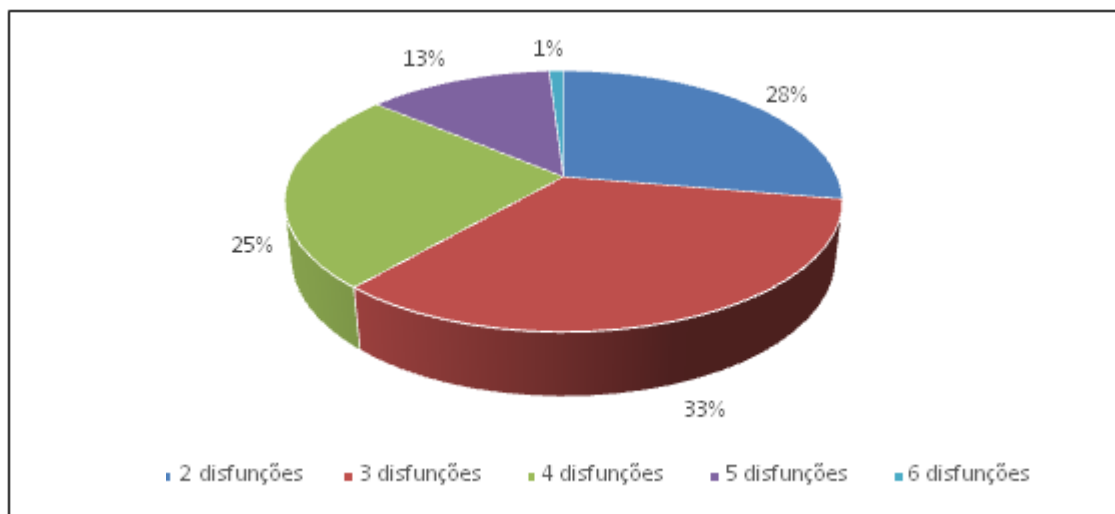


Figura 6. Associação de disfunções de órgãos na população estudada (n=101) segundo o SOFA score.

O SOFA médio foi obtido a partir do somatório dos valores máximos das variáveis fisiológicas e laboratoriais de cada um dos doentes nos primeiros três dias de internamento. A média foi efectuada de igual forma para os doentes com apenas dois dias ou um dia de internamento (foi atribuído um dia de internamento aos doentes que faleceram antes das 24 horas).

O SOFA *score* médio assim obtido nos doentes em estudo (n=101) teve uma pontuação total de 901. A pontuação média foi de $8,92 \pm 3,81$. Mais de metade dos doentes estudados (53% de n=101) somaram 15 ou mais pontos no SOFA *score* médio, valor que corresponde geralmente a uma mortalidade superior a 80%.

A figura 7 mostra a distribuição da pontuação obtida com base no SOFA *score* médio nos doentes do presente estudo (n=101).

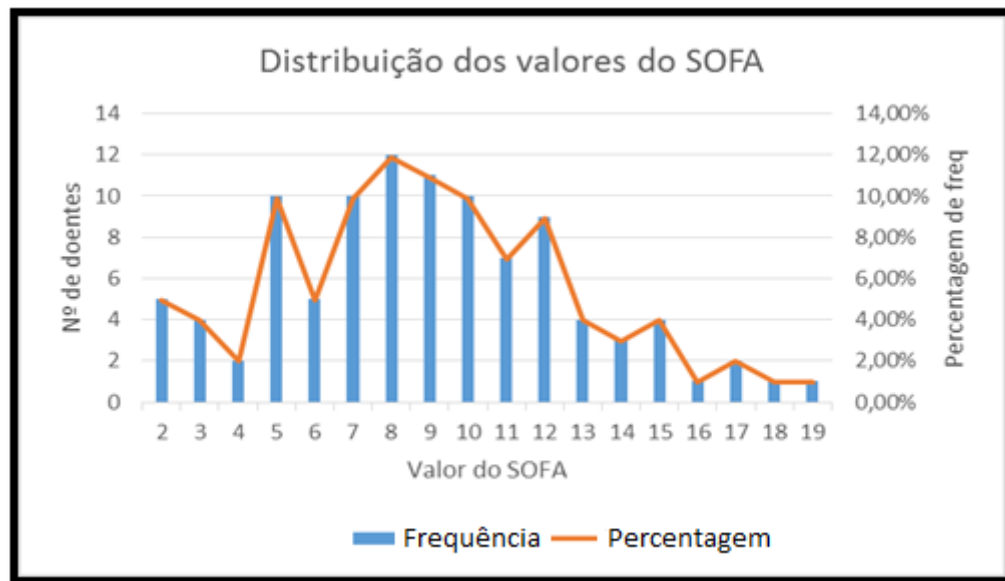


Figura 7. Distribuição da pontuação do SOFA *score* médio nos doentes em estudo (n=101).

No decurso dos três dias de internamento 40,6 % dos doentes em estudo (n=101) beneficiaram de tratamento com técnicas de suporte avançado de órgãos. A tabela 21 resume as técnicas e as associações utilizadas. As técnicas de substituição renal e de ventilação invasiva foram aplicadas em 25,7% e 23,7% dos doentes, respetivamente.

Tabela 21. Registo do tratamento com técnicas invasivas nos doentes estudados (n=101).

Tipo de suporte	Número de doentes	%
Suporte com amins vasoativas	1	0,9
Técnicas dialíticas	15	14,8
Ventilação invasiva	11	10,8
Suporte com amins vasoativas e ventilação invasiva	3	2,9
Suporte com amins vasoativas e técnicas dialíticas	1	0,9
Técnicas dialíticas e ventilação invasiva	9	8,9
Suporte com amins vasoativas, ventilação invasiva e técnicas dialíticas	1	0,9
Sem necessidade de tratamento de suporte	60	59,4
Total	101	100

Foram registados 17 óbitos (16,8%) nos doentes em estudo. A tabela 22 mostra as causas de morte de acordo com o registo efetuado nos processos clínicos dos doentes. A disfunção múltipla de órgãos e a morte cerebral foram as duas principais causas de morte (somatório 35,2%).

Tabela 22. Causas de morte registadas nos doentes falecidos entre os doentes estudados (n=101).

Causas de morte	Nº de doentes	%
Disfunção múltipla de órgãos	3	17,6
Morte cerebral	3	17,6
Acidose metabólica severa	2	11,7
ARDS	2	11,7
Pneumonia	2	11,7
Distúrbios eletrolíticos	2	11,7
Uremia e distúrbios da coagulação	1	5,8
Insuficiência hepática	1	5,8
PCR súbito	1	5,8
Total	17	100

A análise dos óbitos dos doentes estudados permitiu concluir que cerca de 70% dos falecidos apresentaram pontuações iguais ou superiores a 10 do SOFA médio. As maiores pontuações foram registadas em doentes cujas causas de morte foram as disfunções múltiplas de órgãos e síndrome de *distress* respiratório do adulto (ARDS). Na figura 8 pode analisar-se a pontuação do SOFA *score* médio dos três primeiros dias de internamento de cada um dos doentes falecidos em estudo e as respetivas causas de morte.

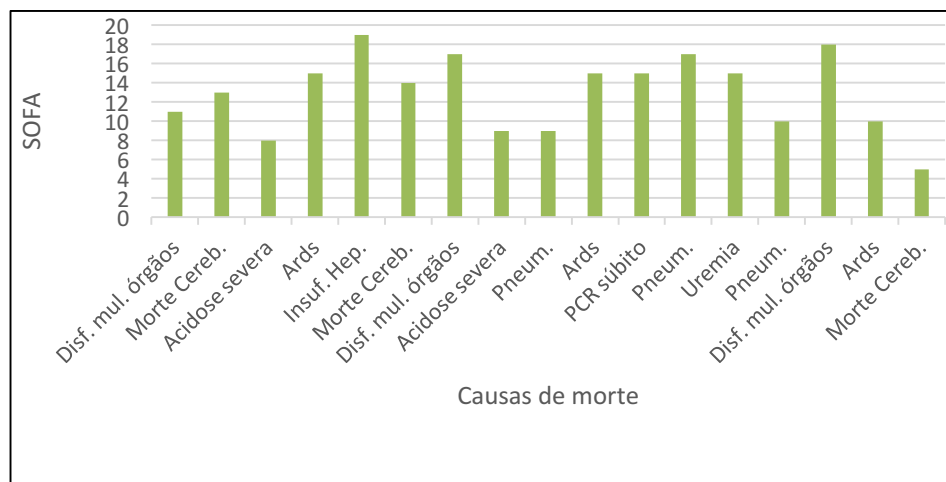


Figura 8. Distribuição da pontuação do SOFA *score* médio nos 17 doentes falecidos e respetivas causas de morte.

Finalmente na tabela 23, analisaram-se para os dois grupos de doentes em estudo (sobreviventes e falecidos) as diferenças entre várias variáveis que se relacionam às disfunções de órgãos e a necessidade de procedimentos invasivos de suporte de vida. A tabela mostra que todas as variáveis indicadas na primeira coluna têm diferenças significativas entre os dois grupos, com exceção da utilização de amins para o tratamento do choque circulatório.

Estes resultados confirmam que o *SOFA score* esteve relacionado com a taxa de fatalidade, que por sua vez foi influenciada pelo número e a gravidade das disfunções de órgãos simultâneas que ocorreram nos doentes graves do presente estudo (n=101). A tabela mostra ainda que no grupo dos doentes sobreviventes se utilizaram maior número de técnicas invasivas para suporte vital de órgãos durante estes três primeiros dias de internamento do que no grupo dos falecidos com diferença significativa (χ^2 , $p < 0,001$).

Tabela 23. Comparação entre os doentes sobreviventes e falecidos em relação à ocorrência de disfunções de órgãos e suporte de vida com técnicas invasivas.

VARIÁVEIS	SOBREVIVENTES (n=84)	FALECIDOS (n=17)	P	Teste
Pontuação média do Glasgow	10,31 ±3,14	7,47 ±3,5	0,001	One-Way ANOVA
Nº doentes com distress respiratório	7	8	<0,001	Chi-Square
Nº de doentes que fez amins	3	1	0,656	Chi-Square
Nº médio disfunções por doente	2,99 ±1,07	4,24 ±0,83	<0,001	Chi-Square
Pontuação média do SOFA	8,1 ±3,24	12,94 ±3,98	<0,001	One-Way ANOVA
Nº técnicas de suporte vital de órgãos	31	25	<0,001	Chi-Square

A taxa de mortalidade global observada nos doentes do presente estudo foi de 16,8% e, quando analisamos a taxa correspondente obtida por aplicação do *SOFA score* médio nestes três primeiros dias de internamento, verificamos que foi muito inferior à esperada (46%).

A figura 9 mostra graficamente a análise realizada nos doentes em estudo (n=101) com base na distribuição dos falecidos pelos diferentes intervalos de percentagens de morte obtidas a partir do cálculo da pontuação do SOFA médio de cada um dos doentes em estudo e diretamente inferidas com a calculadora oficial do *site*.

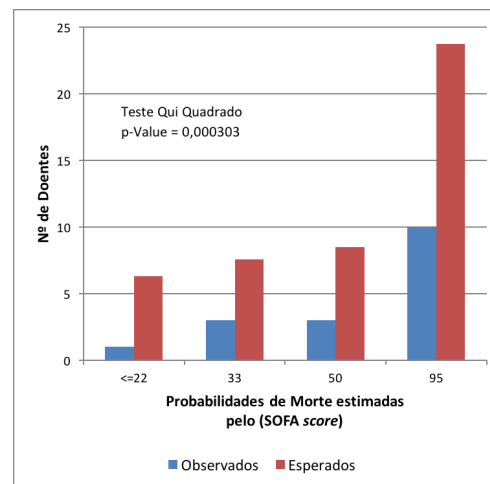
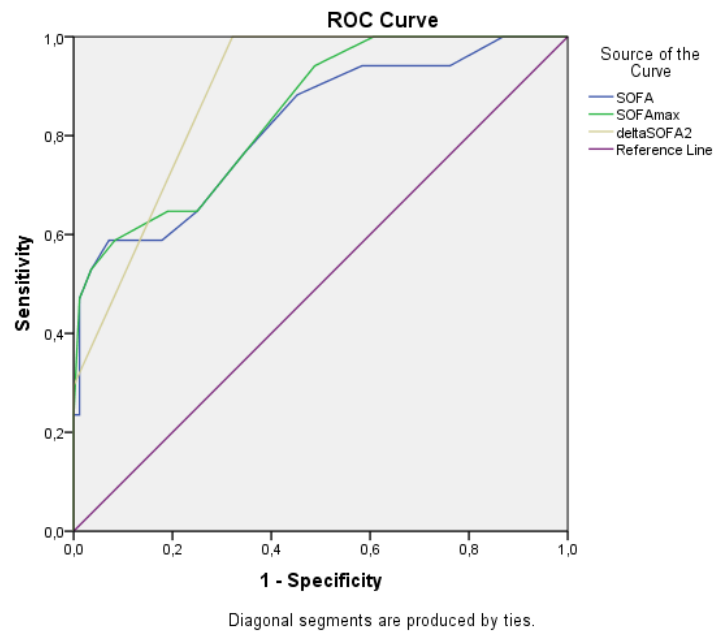


Figura 9. Mortalidade observada nos doentes estudados (n=101) e a inferida pelo SOFA *score* médio.

Foram ainda calculados o SOFAMax e o *deltaSOFA*, que estão representados nas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) da figura 10.

O SOFAMax mostrou resultados idênticos ao SOFA médio, e o *deltaSOFA*, mostrou maior sensibilidade que as variantes anteriores do SOFA (AUC 0,887), nos doentes em estudo (n=101).

Todas as variantes do SOFA *score* foram significativas ($p < 0,01$) e os intervalos de confiança não mostram variação entre elas.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
SOFA	,820	,060	,000	,702	,938
SOFamax	,845	,051	,000	,746	,944
deltaSOFA2	,887	,034	,000	,819	,954

The test result variable(s): SOFA, SOFamax, deltaSOFA2 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Figura 10. Output do Programa SPSS21-IBM mostrando Curvas ROC das 3 variantes de SOFA score em função da mortalidade observada nos doentes do presente estudo (n=101).

Apesar da diferença de pontuação do SOFA médio obtido nos dois grupos de doentes (sobreviventes e falecidos) ser estatisticamente significativa e, individualmente, também todas as variáveis integradas no SOFA se terem revelado com diferenças significativas nos dois grupos de doentes em estudo, a representação das probabilidades de morte (observadas e esperadas) associadas ao SOFA médio previamente apresentada (Figura 9) obrigou a prosseguir a investigação estatística.

A busca de subgrupos homogêneos por *Two-Step Analysis Clusters* permitiu identificar as 4 disfunções de órgãos mais discriminantes de um conjunto inicial de 6 disfunções (Figura 11). As disfunções hematológica e cardiovascular não se revelaram discriminantes nesta primeira análise de *clusters* (ver também anexo 2).

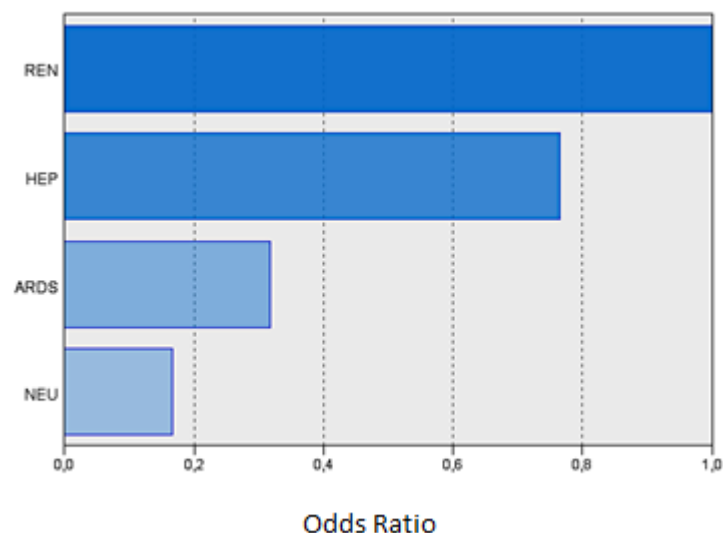


Figura 11. Representação gráfica das 4 disfunções de órgãos identificadas na primeira análise por clusters e seu poder discriminante nos doentes em estudo (n=101).

Com base exclusivamente nestas quatro disfunções de órgãos foi feita uma segunda análise de *clusters* que permitiu definir um conjunto de 6+1 subgrupos homogêneos. A figura 12 mostra o poder discriminante registado durante esta segunda análise de *clusters*, apenas neste conjunto de 4 disfunções.

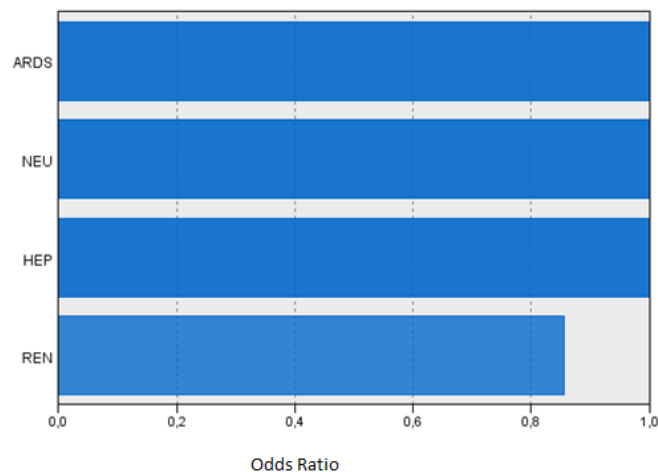


Figura 12. Representação gráfica das 4 disfunções de órgãos identificadas na segunda análise por *clusters* e seu poder discriminante nos doentes em estudo (n=101).

Estas quatro disfunções discriminantes são as que frequentemente são referidas como preditivas para a mortalidade em vários outros estudos efetuados com doentes com malária grave tratados em UCIs (Lalloo *et al.*, 1996, Koh *et al.*, 2004, Krishnan & Karnad, 2003) variando pouco entre eles.

Os seis *clusters* obtidos (n=94) mostram boa coesão e diferenciação e proporcionalmente estão representados na figura 13. O *cluster* “atípico” adicional (n=7) inclui um conjunto heterogéneo de casos que não são classificáveis nos seis *clusters* principais.

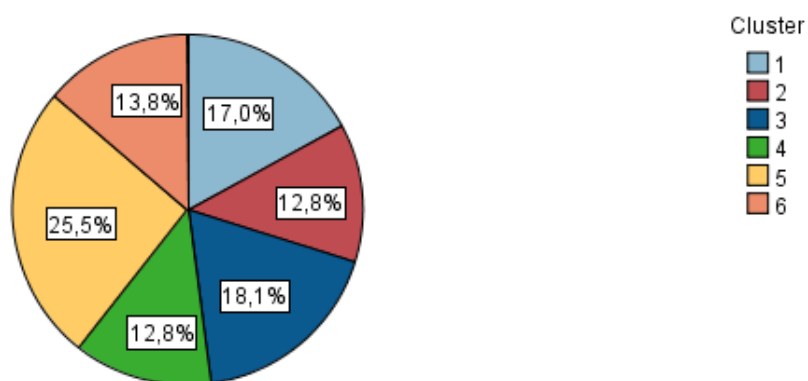
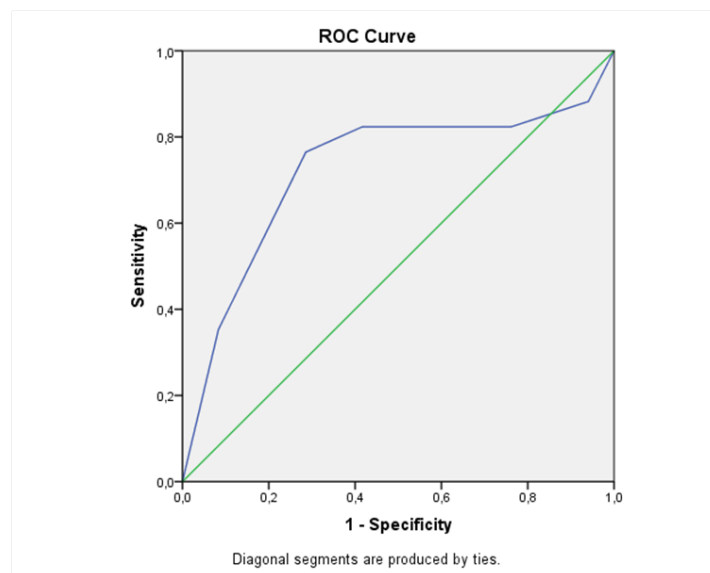


Figura 13. Representação gráfica da proporção dos seis *clusters* (número 1 a 6) obtidos por análise multivariada com base nas quatro disfunções de órgãos mais discriminantes presentes nos doentes em estudo (n=94).

A figura 14, através de uma curva ROC, mostra a sensibilidade e especificidade dos *clusters* assim obtidos (6 +1) em relação à mortalidade observada nos doentes em estudo.

O ponto de corte foi o *cluster* 3 (ver também anexo 4), e a área debaixo da curva (AUC=0,724) é muito significativa ($p<0,01$) demonstrando que a identificação destes *clusters* a partir das quatro disfunções de órgãos consideradas discriminantes mostra muita sensibilidade e especificidade.

Este resultado deixa um grau muito aceitável de conforto para manter os *clusters* na investigação posterior como representativos dos doentes do presente estudo.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): TwoStep Cluster Number

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,724	,081	,004	,566	,883

The test result variable(s): TwoStep Cluster Number has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Figura 14. Output do Programa SPSS21-IBM representando uma Curva ROC dos *Clusters* de disfunções em função da mortalidade observada no presente estudo (n=101).

A figura 15, foi obtida após a segunda fase da classificação por *clusters* e permite verificar a qualidade da coesão e separação destes *clusters* classificados estaticamente em função das 4 disfunções orgânicas discriminantes.

A distribuição da mortalidade pelos diversos *clusters* (6+1) mostra que os doentes do presente estudo com maior número de disfunções simultâneas tiveram muito mais baixa taxa de fatalidade do que a prevista pelo SOFA *score*.

Por outro lado, as taxas de mortalidade dos doentes em estudo incluídos nos diversos *clusters* não variaram de forma significativa entre as duas variantes do SOFA (médio e *max*), com exceção do *cluster* “atípico” (que inclui 7 doentes da amostra) onde a mortalidade observada coincidia com a esperada pelo SOFA médio, mas foi esta foi muito superior quando inferida a partir do SOFA_{max}.

Os doentes incluídos nos *clusters* 5 e 6 registaram taxas de fatalidade de 29 e 46%, quando eram esperadas mortalidades entre 72 e 78%, respetivamente.

Verificamos ainda que a disfunção neurológica esteve presente em todos os doentes falecidos, sempre associada a outras disfunções discriminantes.

Mas importa realçar que foram admitidos 17 doentes com disfunção neurológica associada à anemia e ou trombocitopenia (*cluster* 3) e que nestes doentes não se registou nenhum óbito. Curiosamente foi o *cluster* onde as duas taxas de mortalidade do SOFA médio eSOFA_{max} se aproximaram.

Critérios de Classificação							
ARDS	-	-	-	-	Atípico	-	+
HEP	+	-	+	-		+	+
NEU	-	+	+	+		+	+
REN	+	-	-	+		+	+
Cluster							
	2	3	1	4	-1	5	6
Falecidos			1	1	2	7	6
Sobreviventes	12	17	15	11	5	17	7
Total Geral	12	17	16	12	7	24	13
Taxa Sobrevivência	100.00	100.00	93.75	91.67	71.43	70.83	53.85
Taxa Mortalidade Obs.	0.00	0.00	6.25	8.33	28.57	29.17	46.15
Média Prob.Morte SOFA	28.17	21.59	35.19	33.75	29.43	72.00	77.69
Média Prob.Morte SOFamax	33.00	22.47	40.25	38.91	48.11	75.29	76.38

Total Geral	17
	84
	101

Model Summary

Algorithm	TwoStep
Inputs	4
Clusters	6

Cluster Quality

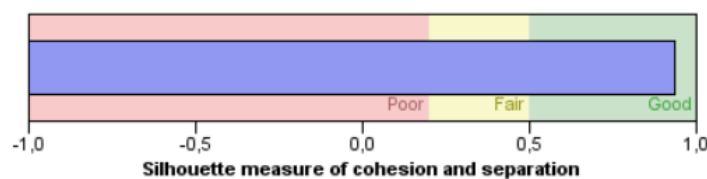


Figura 15. Separação das variáveis (disfunções de órgãos) com poder preditivo e análise estatística dos *clusters* obtidos em relação à mortalidade observada/mortalidade esperada pelo SOFA *score* nos doentes estudados (n=101), figura obtida do Programa SPSS21-IBM

A disfunção múltipla de órgãos é a principal causa de morbidade e mortalidade nas UCIs (Medicine, 1992). A correlação entre o grau de falência orgânica avaliada pelo SOFA *score* e a mortalidade está bem estabelecida (Cabré et al., 2005). O número de disfunções de órgãos simultâneas tem correlação positiva com a mortalidade. Doentes com 3 e mais disfunções têm mais alta probabilidade de morte (Mishra et al., 2007, Janssens et al., 2000). No presente estudo, os doentes com três ou mais do que três disfunções orgânicas constituíram 71% da amostra e com quatro ou mais de quatro disfunções 39%. A pontuação média do *score* SOFA da nossa amostra foi de 8,92

pontos com desvio padrão de $\pm 3,81$. A diferença da pontuação média do SOFA *score* entre os doentes que sobreviveram e os falecidos mostrou que foi muito significativa, sendo a média mais elevada nestes últimos ($p < 0,001$). Num estudo efetuado com uma amostra de 400 doentes com malária grave importada, incluindo 45 Unidades Intensivas em França, esta diferença também foi significativa mas com valores mais extremos da pontuação média do SOFA *score* (no grupo dos sobreviventes 7,7 para 8,1 no nosso estudo e dos falecidos 15,4/12,94 respetivamente) (Bruneel *et al.*, 2010). Outro estudo prospetivo coorte, efetuado na Bélgica em 1991, com a inclusão de 352 doentes internados em 31 camas de diferentes UCIs demonstrou que a pontuação de 11 pontos ou mais ou a média de cinco pontos do SOFA *score* obtido nas primeiras 48 horas de internamento se correlaciona bem com a mortalidade independentemente da duração do internamento (Ferreira *et al.*, 2001).

A alteração do estado de consciência por mais de meia hora, sem outra causa detetável, e a presença de agitação e convulsões foi registada em 84,1% dos doentes do presente estudo. A malária cerebral pode ocorrer isolada ou simultaneamente com outras disfunções de órgãos. É consensualmente uma das principais causas de morte pela doença em qualquer idade (Gomes *et al.*, 2011). A malária cerebral foi o principal critério de internamento em 17 doentes estudados (associada a anemia e/ou trombocitopenia) constituindo o *cluster* número 3 do presente estudo. Porém, não se registou nenhum óbito neste subgrupo específico. Provavelmente teve impacto muito positivo no *outcome* a existência de um protocolo hospitalar que orienta a entubação orotraqueal precoce do doente com coma malárico, classificado com *Glasgow* \leq a 7 pontos, permitindo uma ventilação adequada, evitando a hipercapnia que agrava a hipertensão intracraniana e como profilaxia de episódios de broncoaspiração para além do início imediato do tratamento com quinino EV. que foi administrado com dose de carga (20mg por Kg/peso).

A insuficiência renal aguda, de um modo geral, é preditiva para a mortalidade nos doentes críticos como fator de risco específico e independente qualquer que seja a doença de base (Metnitz *et al.*, 2002). Num estudo efetuado na Malásia numa população de 28 doentes críticos com malária grave por *P. falciparum* a insuficiência renal aguda foi a principal complicação (46,4%) e esteve correlacionada com a mortalidade (Koh *et*

al., 2004). Também no presente estudo ficou incluída no grupo das disfunções com poder preditivo para o *outcome* e registada em 58,4% dos doentes. Para a identificação e registo da disfunção renal foram utilizados os critérios de RIFLE. De um modo geral a classificação de AKI permite a identificação precoce da disfunção renal nos doentes graves e o início atempado das técnicas dialíticas com impacto positivo no *outcome*. Num estudo retrospectivo efetuado na Tailândia em 257 doentes com malária grave (Trang *et al.*, 1992) os critérios de RIFLE mostraram-se bem adaptados, e comparativamente aos critérios da WHO tiveram impacto na redução da taxa de fatalidade intra-hospitalar, quer pela identificação precoce dos grupos 1 (*injury*) e F (*failure*), que correspondem aos estádios 1 e 2 de AKI, quer pelo início em tempo adequado das técnicas dialíticas. Os doentes que fizeram substituição renal por técnicas dialíticas perfizeram 25,7% dos casos do presente estudo estando incluídos também os que fizeram diálise por acidose metabólica severa e/ou outros distúrbios hidroelectrolíticos (hipercaliemia e hipernatremia) ainda sem elevação da creatinina sérica, nos limites preconizados pela WHO.

O valor médio das transaminases (alanina e aspartato aminotransferases) esteve moderadamente elevado (cerca de duas vezes, para a AST e três vezes para a ALT), o que está de acordo com a literatura (Kochar *et al.*, 2003). Na Índia em 2007, Das e colaboradores, num estudo de 301 doentes com compromisso hepático na malária por *P. falciparum* observaram que não houve diferença entre os valores das transaminases, que estiveram elevadas cerca de duas vezes, e com a bilirrubina total elevada até valores extremos de 36 mg/dL. Apesar de não se verificar alteração nos valores das proteínas totais, e na albumina sérica em particular, a disfunção hepática foi fator de mau prognóstico (Das *et al.*, 2007).

No presente estudo não se registou nenhum caso de coagulação intravascular disseminada.

O *distress* respiratório ocorreu em 15,8% dos doentes do presente estudo e 8 doentes tiveram o diagnóstico de ARDS mas houve necessidade de ventilação invasiva em 23,7% dos doentes. O critério utilizado para início da ventilação invasiva nos doentes com *distress* respiratório foi a $PaO_2 \leq 60$ mmHg com $FiO_2 \geq 0,21$. Cerca de metade dos doentes foi ventilado por depressão grave da consciência, hipoventilação secundária a

sedação profunda para controlo de agitação e presença de convulsões repetidas, acidose metabólica severa e/ou infeção respiratória associada. O ARDS ocorre geralmente mais tardiamente na evolução da doença e está descrito não ter correlação com o pico da parasitémia surgindo quando a gota espessa é muito baixa ou mesmo negativa (Marks *et al.*, 2013).

O choque circulatório ocorreu em quatro doentes em estudo. Um destes doentes faleceu. Estatisticamente a disfunção cardiovascular não teve valor preditivo, provavelmente por ter sido registada em menor número na nossa amostra (n= 4). A patogénese do choque circulatório na malária continua mal compreendida sendo pouco claro se o *P. falciparum* contribui diretamente para o choque, embora esteja geralmente associado a mau prognóstico (Bruneel *et al.*, 1997). Embora não considerada como uma manifestação da malária severa, há evidências que mostram que a disfunção cardíaca pode complicar a evolução da doença. Alguns estudos recentes comprovaram a elevação das enzimas tradicionalmente marcadoras de lesão miocárdica, incluindo o peptídeo natriurético tipo B (NT proBNP) que é proposto mais recentemente, em doentes com malária grave por *P. falciparum* (Marks *et al.*, 2014).

A taxa de fatalidade observada no presente estudo foi de 16,8% e está dentro da variação relatada nas UCIs (Bruneel *et al.*, 2010, Koh *et al.*, 2004). No entanto foi muito mais baixa do que a mortalidade média global esperada com base na pontuação prognóstica do SOFA *score* médio (46%). Analisada a população de falecidos e comparando a ocorrência de morte com a probabilidade preditiva do SOFA *score* médio verificamos que em todos os intervalos de probabilidades de morte a taxa de fatalidade observada dos doentes estudados foi inferior à esperada e com maior diferença nos grupos com maior pontuação do SOFA *score*. Após a obtenção estatística dos diferentes *clusters*, com base na classificação das disfunções orgânicas preditivas para a mortalidade, foi confirmado que os doentes que apresentaram maior número de falências tiveram melhores resultados nas taxas de mortalidade do que as previstas pelo SOFA *score* (SOFA médio e SOFA_{max}). Estes resultados permitem concluir, tal como Krishnan e colegas que o SOFA *score* não parece adaptado para prever a mortalidade nos doentes com malária grave (Krishnan & Karnad, 2003).

Entretanto, a análise de regressão e correlação efetuada nos doentes em estudo representada na figura 16 demonstra que existe correlação muito significativa entre o SOFA *score* e o MAS, um *score* de gravidade e prognóstico preconizado por Krishnan e colaboradores na Índia (ANOVA, $p < 0,00001$), contribuindo o presente estudo para confirmar a correlação entre os *scores* MAS e SOFA. (ver também anexo 3)

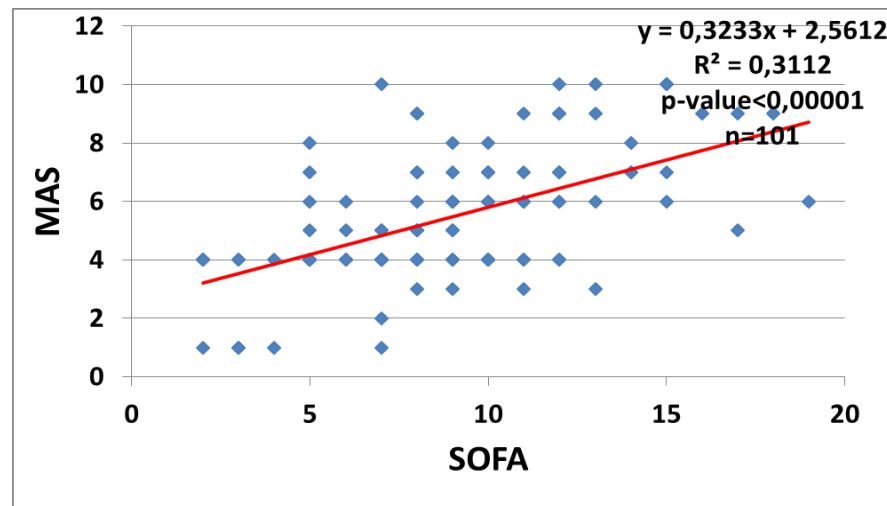


Figura 16. Regressão e correlação linear, nos doentes em estudo ($n=101$), entre os dois *scores* de gravidade e prognóstico SOFA e MAS.

Foram registados no total 618 dias de internamento para os 101 doentes em estudo com uma média de estadia de 6,1 dias $\pm 0,37$. A média de estadia dos doentes sobreviventes (6,6 dias $\pm 0,4$) foi quase o dobro dos doentes falecidos (3,7 dias $\pm 0,7$) e esta relação foi significativa (ANOVA, $p=0,002$).

O tempo médio de internamento dos falecidos sendo apenas de 3,7 dias, permite ter alguma segurança para concluir que a maior parte dos doentes faleceu em consequência das complicações da malária grave. Janssens e colaboradores observaram nos doentes falecidos uma maior pontuação do SOFA *score* no primeiro dia de internamento correlacionando-se com óbito antes das primeiras 24 horas e obteve um valor médio de SOFA de $5,9 \pm 3,7$ para os doentes falecidos num estudo realizado com 303 doentes internados numa UCI médica da Alemanha.

4.4. EXAMES LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM*

As amostras de sangue total obtidas no primeiro dia de internamento dos doentes em estudo foram conservadas a 20 graus negativos e posteriormente processadas para a realização de testes para diagnóstico específico da infecção por *Plasmodium*.

A infecção por *P. falciparum* foi confirmada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) efetuada no IHMT em todos os doentes do estudo (n=101), com confirmação da infecção por *P. falciparum* em todos os doentes (resultado não apresentado).

Foram efetuados simultaneamente doseamentos de anticorpos anti-*Plasmodium spp* e anti-*P. falciparum* utilizando a técnica ELISA.

Na figura 17 representa-se a dispersão dos valores obtidos no doseamento dos anticorpos anti-*plasmodium spp*, onde 74% dos valores foram superiores ao *Cut-off* (que foi calculado em 0,5) nas amostras de sangue dos doentes em estudo (n=101).

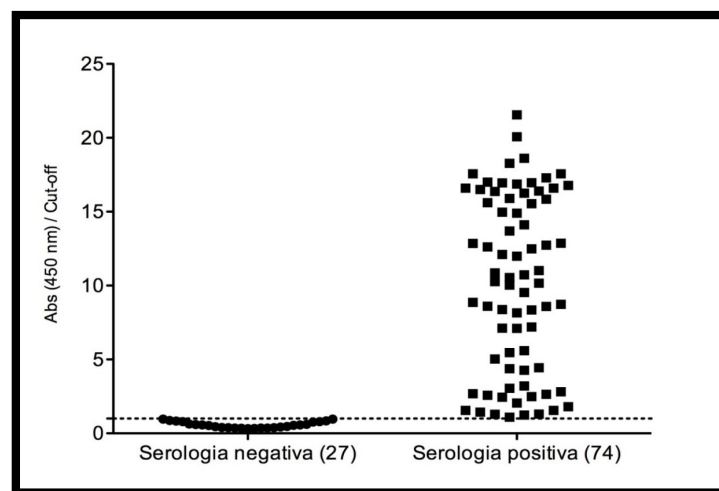


Figura 17. Dispersão dos valores obtidos no doseamento de anticorpos anti-*plasmodium spp* nos doentes em estudo (n=101).

Na análise do doseamento dos anticorpos anti-*Plasmodium spp* verificamos que 27 amostras dos doentes em estudo (26,7%) apresentaram valores abaixo do *Cut-off*.

Comparando estes valores com os obtidos no doseamento de anticorpos IgG totais anti-*P. falciparum*, utilizando um protocolo do IHMT, verificamos que na população de negativos apenas 5 doentes mantêm valores ligeiramente superiores ao *Cut-off* calculado em 1,0 nos doseamentos das amostras correspondentes aos doentes numerados na base de dados A1, A32, A48, A59 e A66. Neste grupo de doentes: 2 são estrangeiros e com permanência em Angola inferior a 6 meses; e 4 deles apresentaram parasitémias abaixo de 1.000 parasitas por μL .

Todos os doentes em estudo apresentaram valores de anticorpos IgG totais anti *P. falciparum* acima do *Cut-off* calculado em 1, e estão representados num gráfico de dispersão na figura 18. Da população de doentes do presente estudo apenas 6 apresentam doseamentos muito perto do *Cut-off*.

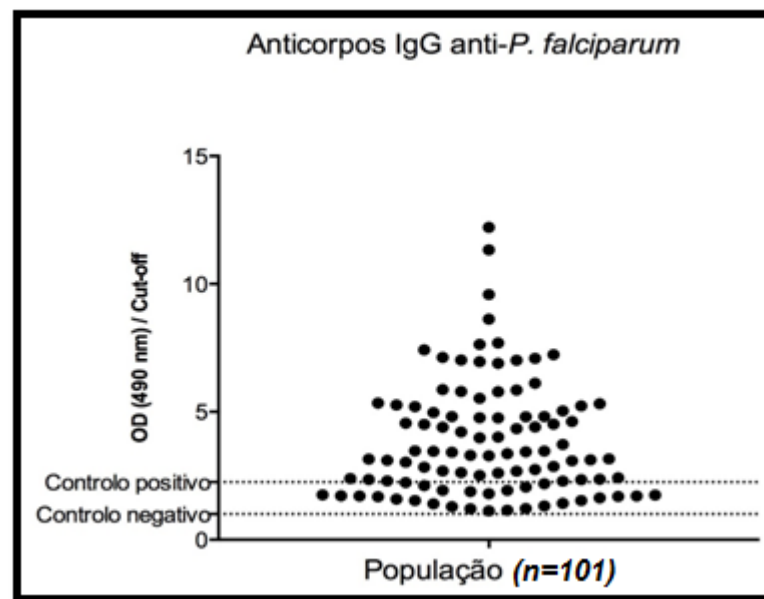


Figura 18. Dispersão dos valores obtidos dos anticorpos IgG totais anti-*falciparum* nos doentes em estudo (n=101).

Na figura 19 representa-se a dispersão dos doseamentos dos anticorpos IgM anti-*P. falciparum* nos doentes do presente estudo. Todos os valores obtidos estão superiores ao *Cut-off* (1).

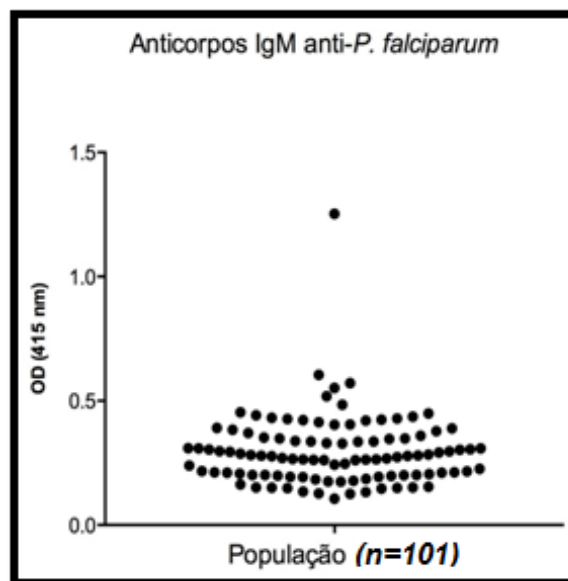


Figura 19. Dispersão dos valores obtidos no doseamento dos anticorpos IgM anti-*falciparum* nos doentes em estudo (n=101).

As tabelas 24 e 25 mostram as análises estatísticas realizadas aos valores obtidos no doseamento dos diferentes anticorpos IgG anti-*Plasmodium spp.* (IgG e IgM) Anti-*P. falciparum*. Os valores obtidos não tiveram correlação significativa com a distribuição da parasitemia periférica (*One-Way* ANOVA, $p=0,639$, $p=0,327$ e $p=0,295$ tabela 24) nem com os grupos dos doentes sobreviventes e dos falecidos *One-Way* ANOVA, $p<0,997$, $p<0,200$, $p<0,716$, tabela 25).

Tabela 24. Análise estatística da correlação entre os diferentes anticorpos IgG anti-*Plasmodium spp* e IgG IgM anti-*P. falciparum* em função da parasitemia periférica (*Output* do Programa SPSS21.-IBM).

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IgG total spp	Between Groups	75,202	3	25,067	,566	,639
	Within Groups	4254,603	96	44,319		
	Total	4329,805	99			
IgGP_falc	Between Groups	17,922	3	5,974	1,166	,327
	Within Groups	481,743	94	5,125		
	Total	499,665	97			
IgM	Between Groups	2,137	3	,712	1,254	,295
	Within Groups	55,090	97	,568		
	Total	57,227	100			

Tabela 25. Análise estatística da correlação entre os diferentes anticorpos IgG anti-*Plasmodium spp* e IgG IgM anti-*P. falciparum* em função da mortalidade (*Output* do Programa SPSS21-IBM).

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IgGtotal spp	Between Groups	,001	1	,001	,000	,997
	Within Groups	4329,804	98	44,182		
	Total	4329,805	99			
IgGP_falc	Between Groups	8,529	1	8,529	1,667	,200
	Within Groups	491,136	96	5,116		
	Total	499,665	97			
IgM	Between Groups	,077	1	,077	,133	,716
	Within Groups	57,150	99	,577		
	Total	57,227	100			

Achidi e colegas num estudo realizado nos Camarões em 2012 com uma amostra de (n=649) crianças observaram que os valores dos anticorpos IgG anti-*P. falciparum* eram significativamente mais elevados nas crianças com doença sintomática do que nas crianças controlo e igualmente significativos entre as crianças com malária grave, sendo mais elevados nestas crianças. Também observaram que o valor dos anticorpos IgG anti-*P. falciparum* aumentou com a idade, sugerindo ser esta um fator de proteção para a doença, e correlacionando-se negativamente com a densidade parasitária (Achidi *et al.*, 2012).

Os valores obtidos no doseamento dos anticorpos IgM anti-*P. falciparum* nos doentes em estudo estão de acordo com a literatura consultada (Boudin *et al.*, 1993, Rowe *et al.*, 2002) validando a afirmação que doentes com formas graves de malária apresentam valores elevados de IgM. Existem, no entanto, controvérsias no que diz respeito ao papel desta imunoglobulina na patogénese da doença. Nalguns trabalhos houve relação com a formação de rosetas e noutros estudos foi sugerido que estes anticorpos podem ter um papel específico na proteção contra a doença.

Analizou-se os resultados obtidos com os testes rápidos de diagnóstico (TRD) comparativamente aos doseamentos de anticorpos anti- *Plasmodium spp* e anti-*P.*

falciparum. Os testes rápidos para deteção de antígenos totais anti-*P. falciparum* e *P. malariae* foram negativos em 15 doentes (14,8%) dos doentes estudados (n=101).

A tabela 26 mostra que neste grupo de doentes, 4 apresentaram valores negativos (abaixo ou próximo do *Cut-off* 0,5) de anticorpos IgG totais anti-*Plasmodium spp*, mas todos estes doentes apresentaram valores positivos de anticorpos IgG totais anti-*P. falciparum* (*Cut-off* 1), o que lhes confere imunidade adquirida específica para a espécie.

Entretanto o doseamento dos anticorpos IgM anti-*P. falciparum*, com execução da amostra A36, mostrou boa reatividade serológica (*Cut-off* 1) em todas as outras amostras dos doentes observadas, sugerindo presença de infecção aguda.

Tabela 26. Valores de anticorpos IgG anti-*Plasmodium spp* e IgG e IgM anti-*P. falciparum* obtidos nas amostras de sangue com TRD falsos negativos nos doentes em estudo (n=101).

ID	Anticorpos totais anti- <i>Plasmodium spp</i>	IgG anti- <i>P. falciparum</i>	IgM anti- <i>P. falciparum</i>
A8	1,81	3,15	1,91
A16	0,46 ^{4*}	2,19	1,66
A24	7,12	2,51	2,24
A36	1,10	1,75	0,74*
A39	7,20	3,16	1,52
A41	12,10	2,42	1,27
A46	2,58	1,71	1,80
A59	0,53*	1,40	2,71
A61	10,17	6,96	2,26
A71	7,10	1,22*	2,06
A77	10,03	5,79	2,69
A90	0,54*	3,03	1,65
A93	4,44	2,83	1,37
A97	2,48	5,31	1,36
A98	0,32*	3,45	2,01

⁴ *Valores no intervalo entre controlo positivo e negativo

Efetuada uma análise da variância dos valores obtidos no doseamento das subclasses dos anticorpos IgG anti-*P. falciparum* verificamos na tabela 27 que não apresentam correlação significativa com a parasitêmia periférica.

Tabela 27. Análise de variância da distribuição dos valores das subclasses dos anticorpos IgG anti-*P. falciparum* em associação com a parasitêmia periférica dos doentes em estudo (n=101) obtida no *Output* do programa SPSS21-IBM.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IgG1	Between Groups	2,198	1	2,198	,217	,642
	Within Groups	992,283	98	10,125		
	Total	994,481	99			
IgG3	Between Groups	,004	1	,004	,019	,891
	Within Groups	20,734	98	,212		
	Total	20,738	99			
IgG4	Between Groups	,081	1	,081	,062	,804
	Within Groups	125,782	97	1,297		
	Total	125,863	98			

No entanto, ao efetuarmos a análise utilizando a classificação em *clusters*, descrita anteriormente baseada nas disfunções observadas, obtivemos correlação significativa nos doseamentos das subclasses dos anticorpos IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) anti-*P. falciparum* quando relacionados com a parasitêmia periférica para alguns destes *clusters*. Estes resultados devem ser analisados com cautela dada o baixo número de doentes de cada *cluster*.

Na figura 20 representa-se graficamente os valores dos anticorpos IgG1 anti-*P. falciparum* e a parasitêmia periférica obtidos nos doentes do *cluster* “atípico”. No entanto, obtivemos uma correlação positiva significativa entre as duas variáveis (p=0,024).

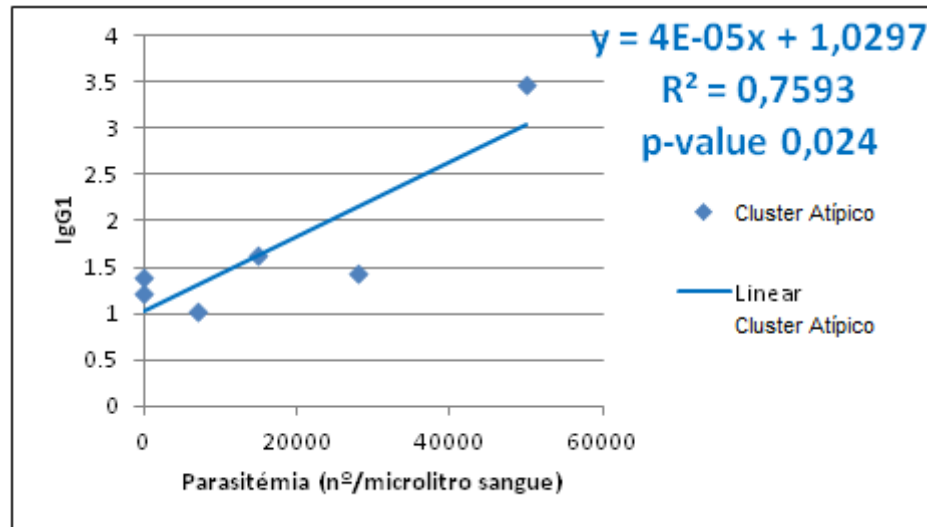


Figura 20. Representação gráfica da correlação entre os valores de IgG1 anti-*P. falciparum* e a densidade parasitária para o *cluster* atípico (n=7).

Na figura 21 representa-se a correlação entre o doseamento dos anticorpos IgG3 anti-*P. falciparum* e a parasitemia periférica que foi encontrada em 2 dos 7 *clusters*. Em ambos os *clusters* atípico e 2 a correlação foi positiva. Mantém-se uma correlação positiva no *cluster* atípico tal como aconteceu com o doseamento dos anticorpos IgG1 anti-*P. falciparum* cuja interpretação merece uma investigação particularizada e exaustiva posterior. Mas, o *cluster* 2 também com correlação significativa (ANOVA, $p=0,036$) representa um grupo de 12 doentes com falência hepática e renal, não se tendo registado nenhum óbito no grupo. Os doseamentos foram efetuados nas amostras de sangue total colhidas no primeiro dia do internamento e podem sugerir um efeito protetor dos anticorpos IgG3 anti-*P. falciparum* na malária grave com estas disfunções de órgãos tal como é citado na literatura (Versiani *et al.*, 2013).

No *cluster* 3 não se encontrou *p value* significativo (ANOVA, $p=0,090$) mas realçamos este dado porque o *cluster* 3 agrupa 17 doentes internados por malária cerebral com anemia e/ou trombocitopenia (no presente estudo a disfunção hematológica não foi considerada como fator discriminante para a formação dos *clusters* não tendo sido associada a risco para a mortalidade). Neste grupo de doentes também não se registou nenhum óbito e os valores dos anticorpos IgG3 anti-*P. falciparum* variaram no sentido inverso da parasitemia.

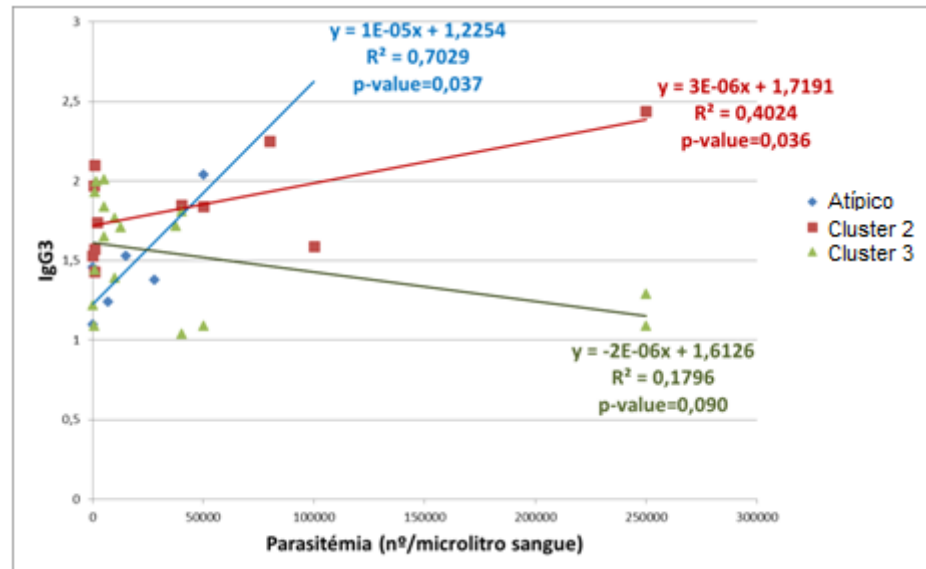


Figura 21. Representação da distribuição dos valores dos anticorpos IgG3 anti-*P. falciparum* em função da parasitêmia periférica dos doentes em estudo.

A figura 22 representa a única correlação altamente significativa encontrada no doseamento dos anticorpos IgG4 anti-*P. falciparum*. No *cluster* 4 (que engloba 12 doentes com disfunção neurológica e renal) encontrou-se uma tendência positiva entre o valor dos anticorpos IgG4 anti-*P. falciparum* e a parasitêmia periférica (ANOVA, $p=0,0096$).

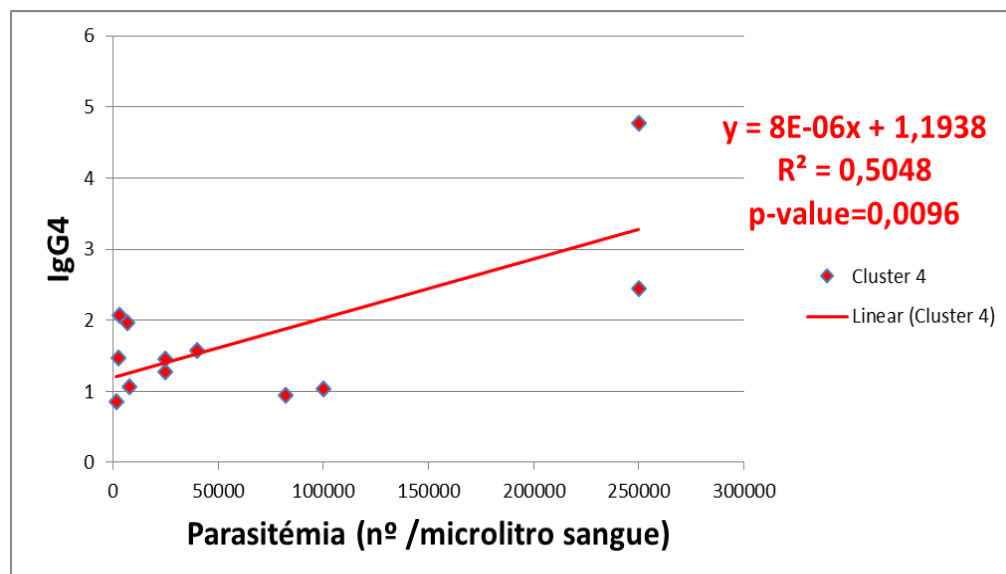


Figura 22. Representação da distribuição dos valores dos anticorpos IgG4 anti-*P. falciparum* em função da parasitêmia periférica do *cluster* 4.

Para concluir, achou-se pertinente investigar os doentes em estudo classificados em três grupos em relação ao estado imunitário no que diz respeito aos valores dos doseamentos dos anticorpos IgG totais anti-*Plasmodium spp* e os anticorpos IgG e IgM anti-*P. falciparum*.

Na figura 23, em representação gráfica verifica-se que a reatividade serológica dos doentes incluídos nos casos especiais, nomeadamente doentes com SIDA e baixa contagem de TCD4 (TCD4 menor que 500 células por μL), é maior do que a dos doentes considerados semi-ímmunes (autótones e/ou com residência superior a seis meses consecutivos em Angola ou outro país onde a infeção se transmite).

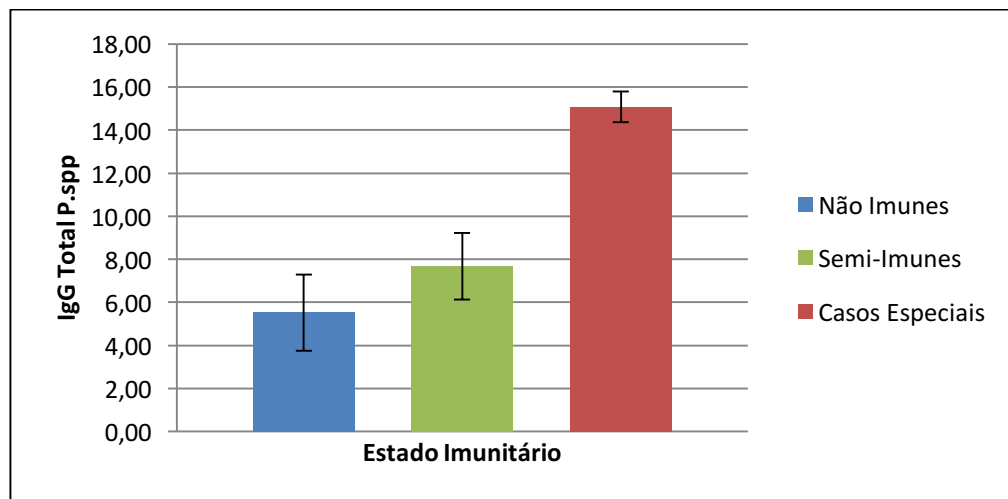


Figura 23. Distribuição dos anticorpos IgG totais anti-*Plasmodium spp* na população em estudo (n=101) considerando o local e tempo de residência.

Os doentes com SIDA apresentaram uma tendência para maior reatividade serológica no doseamento dos anticorpos totais IgG anti-*P. falciparum* do que os doentes dos outros dois grupos em estudo (embora sem diferença estatisticamente significativa) e igual reatividade para os anticorpos IgM anti-*P. falciparum* que o grupo dos doentes classificados de semi-ímmunes, aqui graficamente representados na figura 24. Entre os outros dois grupos a reatividade é muito similar.

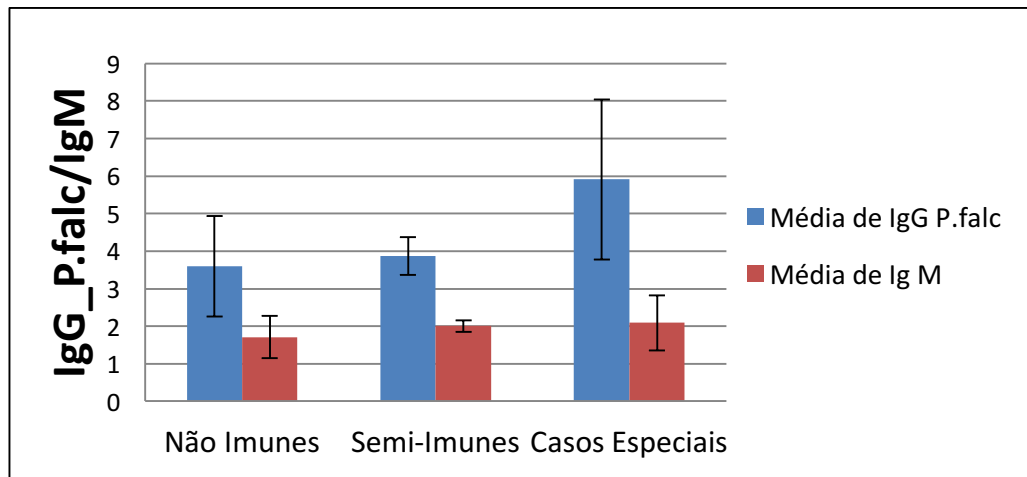


Figura 24. Relação entre os valores dos anticorpos IgG anti-*P. falciparum* entre os grupos de doentes semi imunes, não imunes e casos especiais dos doentes em estudo (n=101).

Embora sem significância estatística (χ^2 p=0,62) em relação ao *outcome*, estes doentes apresentaram amostras com doseamentos mais elevados quer dos anticorpos totais IgG anti-*Plasmodium spp* quer dos anticorpos IgG totais anti-*P. falciparum* do que os doentes semi-imunes e os não imunes. O facto de se tratar de uma amostra muito pequena, particularmente em relação aos doentes com SIDA (n=3), não permitiu explorar o fato curioso de nesta população o número baixo de linfócitos TCD4 aparentemente não ter influenciado a resposta imune humoral específica para a malária. Subramaniam e colaboradores curiosamente também não encontraram correlação entre a contagem de células TCD4 e a carga virémica para VIH com a resposta imune específica traduzida pela identificação de anticorpos IgG para diversos antígenos do *P. falciparum* num estudo comparativo entre doentes com malária com e sem VIH sugerindo que existem outros fatores que contribuem para a resposta inflamatória robusta que se observa nestes doentes (Subramaniam *et al.*, 2015). No entanto, contrariamente, existem outras publicações em que foi encontrada correlação destes doentes com SIDA entre a resposta serológica e a gravidade da doença quer na África do Sul (Cohen *et al.*, 2005) quer na Zâmbia (Chalwe *et al.*, 2009).

V. CONCLUSÕES

1. A amostra estudada constituída por 101 doentes internados consecutivamente com malária grave por *P. falciparum* foi maioritariamente masculina, mais de metade da população era jovem, com uma média de idade de 21 anos e sem co-morbilidade.
2. A maioria dos doentes era autótone e presumivelmente semi-imune para a infeção.
3. Nenhuma das variáveis sociodemográficas estudadas foi estatisticamente significativa quando se comparou o grupo dos doentes sobreviventes com o dos falecidos.
4. Mais de metade dos doentes estudados apresentou baixa parasitémia periférica à admissão ($\leq 2\%$), apesar da gravidade da doença.
5. A densidade parasitária não teve correlação entre o grupo dos doentes sobreviventes e o dos falecidos.
6. Confirmou-se infeção mista (*P. falciparum* + *P. malariae*) em 4 dos doentes do estudo.
7. O teste comercial utilizado para o diagnóstico rápido da infeção foi negativo em 14,9 % dos doentes em estudo. Registaram-se 5 resultados falsos negativos em amostras de doentes com alta parasitémia periférica ($\geq 250.000/\mu\text{l}$).
8. Os doentes apresentaram um perfil de muita gravidade clínica com mais de metade da população de estudo com três, quatro e cinco disfunções de órgãos simultâneas.
9. A malária cerebral, a insuficiência renal e a disfunção hepática e respiratória foram consideradas como factores de risco para a mortalidade observada.
10. Quase metade dos doentes necessitou de técnicas invasivas de suporte de vida.
11. A taxa de fatalidade registada foi muito inferior à esperada aplicando o SOFA *score* médio.
12. O *deltaSOFA* (ROC, AUC 0,887, $p < 0,001$) mostrou maior sensibilidade do que o *SOFAMax* e o SOFA médio, mas manteve baixa capacidade discriminatória para a mortalidade nos doentes em estudo.
13. A análise classificatória de *clusters* com base nas 4 disfunções de órgãos com poder preditivo para a mortalidade confirmou que a redução da mortalidade

observada comparativamente à esperada pelo SOFA *score* se verificou principalmente nos grupos de doentes com maior número de disfunções simultâneas de órgãos.

14. No grupo de doentes internados, por apresentar quadro clínico de malária cerebral associado apenas a anemia e/ou trombocitopenia não se registou nenhum óbito.
15. Encontramos correlação positiva entre os dois *scores* de gravidade e prognóstico: SOFA e MAS (n=101, ANOVA, $p < 0,00001$).
16. Cerca de 27% das amostras de sangue dos doentes em estudo apresentaram doseamentos de anticorpos IgG totais anti-*Plasmodium spp* com valores inferiores ou muito próximos do *Cut-off* (0,5).
17. Todos os doentes do presente estudo apresentaram valores de anticorpos totais IgG e IgM anti- *P. falciparum* acima do *Cut-off* (1).
18. Na primeira análise nenhum dos doseamentos de anticorpos mostrou estar em correlação com a parasitémia periférica, nem com os grupos dos doentes sobreviventes e dos falecidos. Avaliados, no entanto, numa segunda análise, utilizando-se separação por *clusters*, os valores dos doseamentos dos anticorpos IgG3 anti-*P. falciparum* mostraram correlação positiva significativa com a densidade parasitária no *cluster* 2, grupo de 12 doentes com disfunção hepática e renal simultâneas (ANOVA, $p=0,036$) e num outro *cluster* atípico de 7 doentes (ANOVA, $p=0,037$). Em relação aos doseamentos dos anticorpos IgG4 anti-*P. falciparum* encontrou-se associação altamente significativa com tendência fortemente positiva no *cluster* 4, grupo onde se incluem 12 doentes com disfunção cerebral e renal simultâneas (ANOVA, $p=0,0096$), sugerindo que estes anticorpos possam ser um fator de proteção, nesta apresentação de malária grave não cerebral.

VI. PERSPETIVAS FUTURAS

Em Angola, a malária grave por *P. falciparum* é um problema de Saúde Pública que ameaça permanecer nas principais causas de mortalidade do país ainda no decorrer da próxima década.

O custo dos investimentos que devem ser feitos nas determinantes de Saúde, mais concretamente nas medidas de saneamento básico das comunidades, no aumento da escolaridade média da população e da educação para a saúde, prevê-se ser muito elevado e as mudanças de comportamento decorrentes deste tipo de investimentos são geralmente de implementação lenta e não trazem resultados visíveis a curto prazo.

Para além disso, são obstáculos acrescidos os aspetos climáticos e também a dificuldade do controlo epidemiológico das fronteiras do país.

Pelos motivos expostos, a malária por *P. falciparum*, nas diferentes vertentes (molecular, imunológica, clínica, epidemiológica e resposta a fármacos) deve continuar a fazer parte das linhas de investigação das principais entidades científicas do País.

O presente estudo, embora com uma amostra de doentes limitada, pretendeu contribuir para a investigação das formas clínicas graves da doença e mostrar os possíveis caminhos para se procurar correlacionar a produção de anticorpos e de citocinas com as formas de apresentação da doença e o *outcome* dos doentes.

O doseamento das subclasses dos anticorpos IgG poderá ser um caminho para compreender o verdadeiro papel de cada um deles como fator protetor ou de agravamento para as formas graves e o *outcome*.

Embora não tenham sido apresentados no documento, foram também obtidos, ao longo dos trabalhos deste estudo, os doseamentos da proteína C Reativa, um marcador precoce

não específico da resposta inflamatória sistémica, e do fragmento do sistema da coagulação C5a, comum às três vias de ativação do complemento (ver anexos 8 e 9).

Estes dados serão posteriormente trabalhados estatisticamente e de forma complementar irá procurar-se correlação com o doseamento dos anticorpos específicos para a espécie e suas subclasses e de igual modo com as disfunções de órgãos e o *outcome*.

Por outro lado, um dos resultados do presente trabalho evidenciou que o SOFA *score*, embora útil e muito prático para a estratificação diária da disfunção de órgãos, não foi sensível na correlação com o *outcome* na malária grave. Foram calculadas três diferentes variantes do SOFA e nenhuma delas se aproximou dos resultados obtidos em relação ao binómio sobrevivência/falecidos do presente estudo.

O MAS *score*, criado na Índia especificamente para avaliar o prognóstico dos doentes com estas formas graves de malária por *P. falciparum*, embora estatisticamente sobreponível ao SOFA *score* no que se refere à sensibilidade e especificidade representadas na curva ROC apresentada no estudo, também não mostrou melhor aproximação com a mortalidade observada nos 101 doentes da amostra estudada.

Sente-se, portanto, a necessidade de analisar a aplicação sistemática e comparativa destes dois *scores* prognósticos em amostras maiores de doentes com malária grave e deste modo poder validar os mesmos ou encontrar outros modelos mais sensíveis.

A aplicação de ferramentas estatísticas de classificação por *clusters* em populações de maior número de doentes com as formas graves da doença pode abrir novos caminhos para a obtenção de algoritmos aplicáveis para prever com maior certeza a mortalidade destes doentes.

Esta possibilidade poderá ser adicionada em tempo real a futuros estudos das formas de malária grave com base na avaliação diária das disfunções de órgãos

VII.REFERÊNCIAS

- ABBA, K., DEEKS, J. J., OLLIARO, P., NAING, C. M., JACKSON, S. M., TAKWOINGI, Y., DONEGAN, S. & GARNER, P. 2011. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev.* , 6.
- ABBAS, A. B., LICHTMAN, A. H. & POBER, J. S. P. 2000. *In Cellular and Molecular Immunology*, WB Saunders Company.
- ACHIDI, E. A., APINJOH, T. O., ANCHANG-KIMBI, J. K., MUGRI, R. N., NGWAI, A. N. & YAFI, C. N. 2012. Severe and uncomplicated *falciparum* malaria in children from three regions and three ethnic groups in Cameroon: prospective study. *Malar J.*, 11, 215.
- ACHIDI, E. A., APINJOH, T. O., ANCHANG-KIMBI, J. K., YAFI, C. N., BESINGI, R., AWAH, N. W. & TROYE-BLOMBERG, M. 2012. *Plasmodium falciparum* Specific IgE, IgG and Anti-GPI IgG Antibodies in Cameroonian Children with Severe and Uncomplicated Malaria. *International Journal of TROPICAL DISEASE & Health*, 2, 157-172.
- AL-YAMAN, F., GENTON, B., MOKELA, D., RAIKO, A., KATI, S., ROGERSON, S., REEDER, J. & ALPERS, M. 1995. Human cerebral malaria: lack of significant association between erythrocyte rosetting and disease severity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 89, 55-8.
- ALBRECHT, E. A. & WARD, P. A. 2004. Complement-induced impairment of the innate immune system during sepsis. *Curr Allergy Asthma Rep.*, 4, 359-64.
- ALVES, R. F., SILVA, R. P., ERNESTO, M. V., LIMA, A. G. B. & SOUZA, F. M. 2011. Gênero e saúde: o cuidar do homem em debate. *Psicologia: teoria e pratica*, 13, 152-166.
- ANSAR, W., BANDYOPADHYAY, S. M., CHOWDHURY, S., HABIB, S. K. H. & MANDAL, C. 2006. Role of C-reactive protein in complement-mediated hemolysis in Malaria. *Glycoconj. J.*, 23, 233-240.

- ANSAR, W., HABIB, S. K., ROY, S., MANDAL, C. & MANDAL, C. 2009. Unraveling the C-reactive protein complement-cascade in destruction of red blood cells: potential pathological implications in *Plasmodium falciparum* malaria. *Cell Physiol Biochem.*, 23, 175-90.
- ARESE, P., TURRINI, F. & SCHWARZER, E. 2005. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem.*, 16, 133-46.
- ARIBOT, G., ROGIER, C., SARTHOU, J. L., TRAPE, J. F., BALDE, A. T., DRUILHE, P. & ROUSSILHON, C. 1996. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individual living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* , 54, 449-57.
- ASHLEY, E. A. & WHITE, N. J. 2014. The duration of *Plasmodium falciparum* infections. *Malaria Journal* 13, 500.
- AYI, K., TURRINI, F., PIGA, A. & ARESE, P. 2004. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against *falciparum* malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood*, 104, 3364-71.
- BAIRD, J. K. 2013. Evidence and Implications of Mortality Associated with Acute *Plasmodium vivax* Malaria. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 36–57.
- BAIRD, J. K. 2013. Malaria caused by *Plasmodium vivax* : recurrent, difficult to treat, disabling, and threatening to life — averting the infectious bite preempts these hazards. *Pathogens and Global Health*, 107, 479.
- BARTOLONI, A. & ZAMMARCHI, L. 2012. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis.*, 4, e2012026.
- BASHAWRI, L. A., MANDIL, A. A., BAHNASSY, A. A. & AHMED, M. A. 2002. Malaria: hematological aspects. *Ann Saudi Med.*, 22, 372-6.

- BERKLEY, J., MWARUMBA, S., BRAMHAM, K., LOWE, B. & MARSH, K. 1999. Bacteraemia complicating severe malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 93, 283-6.
- BIRKU, Y., WELDAY, D., AYELE, D. & SHEPHERD, A. 1999. Rapid diagnosis of severe malaria based on the detection of Pf-Hrp-2 antigen. *Ethiopian medical journal*, 37, 173-179.
- BOUDIN, C., CHUMPITAZI, B., DZIEGIEL, M., PEYRON, F., PICOT, S., HOGH, B. & AMBROISE-THOMAS, P. 1993. Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens in immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso. *J Clin Microbiol.*, 31, 636-41.
- BROWN, I. N. 1969. Immunological aspects of malaria infection. *Adv Immunol.*, 11, 267-349.
- BRUNEEL, F., GACHOT, B., TIMSIT, J. F., WOLFF, M., BEDOS, J. P., REGNIER, B. & VACHON, F. 1997. Shock complicating severe *falciparum* malaria in European adults. *Intensive care medicine*, 23, 698-701.
- BRUNEEL, F., GACHOT, B., WOLFF, M., REGNIER, B., DANIS, M., VACHON, F. & CORRESPONDING, G. 2001. Resurgence of blackwater fever in long-term European expatriates in Africa: report of 21 cases and review. *Clin Infect Dis.*, 32, 1133-40.
- BRUNEEL, F., TUBACH, F., CORNE, F., MEGARBANE, P., MIRA, B., PEYTEL, J.-P., CAMUS, E., SCHORTGEN, C., AZOULAY, F., COHEN, E., COHEN, Y., GEORGES, H., MEYBECK, A., HYVERNAT, H., TROUILLET, J.-L., FRENOY, E., NICOLET, L., ROY, C., DURAND, R., LE BRAS, J. & WOLFF, M. 2010. Severe imported *falciparum* malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PloS one*, 5, e13236.
- BULL, P. C., KORTOK, M., KAI, O., NDUNGU, F., ROSS, A., LOWE, B. S., NEWBOLD, C. I. & MARSH, K. 2000. *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes agglutination by diverse Kenyan plasma is associated with severe disease and young

host agea in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequencesdium *falciparum* var genes expressed in children from Papua New Guinea. *J Infect Dis.* , 182, 641.

CABRÉ, L., MANCEBO, J., SOLSONA, J. F., SAURA, P., GICH, I., BLANCH, L., CARRASCO, G., MARTIN, M. C. & BIOETHICS WORKING GROUP OF THE SEMICYUCCABRÉ, L. 2005. Multicenter study of the multiple organ dysfunction syndrome in intensive care units: the usefulness of Sequential Organ Failure Assessment scores in decision making. *Intensive Care Med.* , 31, 927–933.

CARLSON, J., HELMBY, H., HILL, A. V., BREWSTER, D., GREENWOOD, B. M. & WAHLGREN, M. 1990. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet*, 336, 1457-60.

CARLSON, J., NASH, G. B., GABUTTI, V., AL-YAMAN, F. & WAHLGREN, M. 1994. Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood*, 84, 3909-3914.

CDC 2012. Malaria : Diagnosis & Treatment. Diseases & Conditions.

CHALWE, V., VAN GEERTRUYDEN, J. P., MUKWAMATABA, D., MENTEN, J., KAMALAMBA, J., MULENGA, M. & D’ALESSANDRO, U. 2009. Increased risk for severe malaria in HIV-1–infected adults, Zambia. *Emerging infectious diseases*, 15, 749.

CHASIS, J. A. & MOHANDAS, N. 2008. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*, 112, 470-8.

CLARK, I. A. & CHAUDHRI, G. 1988. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *British journal of haematology*, 70, 99-103.

CLARK, I. A. & SCHOFIELD, L. 2000. Pathogenesis of malaria. *Parasitol Today*, 16, 451-4.

COHEN, C., KARSTAEDT, A., FREAN, J., THOMAS, J., GOVENDER, N., PRENTICE, E., DINI, L., GALPIN, J. & CREWE-BROWN, H. 2005. Increased

prevalence of severe malaria in HIV-infected adults in South Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 1631-1637.

CONROY, A., SERGHIDES, L., FINNEY, C., OWINO, S. O., KUMAR, S., GOWDA, D. C., LILES, W. C., MOORE, J. M. & KAIN, K. C. 2009. C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria in vitro: potential implications for placental malaria. *PLoS One*, 4, e4953.

CORNACOFF, J. B., HEBERT, L. A., SMEAD, W. L., VANAMAN, M. E., BIRMINGHAM, D. J. & WAXMAN, F. J. 1983. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest*, 71, 236-47.

COSTA, T. C., CONRADO, T. M., BRITO, D. V. B. M., DE BRITO, M. T. F. M. & DE SOUZA AARÃO, T. L. 2015. O Papel das Citocinas Pró-Inflamatórias IFN- γ e TNF- α na Malária Grave-Revisão de Literatura. *NewsLab*, 127.

CRAIG, A. & SCHERF, A. 2001. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Molecular & Biochemical Parasitology* 115.

DAS, S. N., MOHAPATRA, B., MOHANTY, R., DASH, P. C., KAR, K. & DASH, P. K. 2007. Malarial hepatitis as a component of multiorgan failure-a bad prognostic sign. *J Indian Med Assoc.*, 105, 247-50.

DAY, N. P. J., HIEN, T. T., SCHOLLAARDT, T., LOC, P. P., VAN CHUONG, L., CHAU, T. T. H., MAI, N. T. H., PHU, N. H., SINH, D. X. & WHITE, N. J. 1999. The prognostic and pathophysiologic role of pro-and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *Journal of Infectious Diseases*, 180, 1288-1297.

DAY, N. P. J., PHU, N., MAI, N., CHAU, T., LOC, P., CHUONG, L., SINH, D., HOLLOWAY, P., HIEN, T. & WHITE, N. 2000. The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. *Crit Care Med.*, 28, 1833-40.

DONDORP, A. M. 2008. Clinical significance of sequestration in adults with severe malaria. *Transfusion clinique et biologique*, 15, 56-57.

- DONDORP, A. M., INCE, C., CHARUNWATTHANA, P., HANSON, J., VAN KUIJEN, A., FAIZ, M. A., RAHMAN, M. R., HASAN, M., YUNUS, B. E., GHOSE, A., RUANGVEERAYUT, R., LIMMATHUROTSAKUL, D., MATHURA, K., WHITE, N. J. & DAY, N. P. 2008. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe *falciparum* malaria. *J Infect Dis.*, 197, 79-84.
- DONDORP, A. M., LEE, S. J., FAIZ, M., MISHRA, S. K., PRICE, R., TJITRA, E., THAN, M., HTUT, Y., MOHANTY, S. & YUNUS, E. B. 2008. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 151-157.
- DONDORP, A. M., PONGPONRATN, E. & WHITE, N. J. 2004. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop*, 89, 309-17.
- ENAYATI, A. & HEMINGWAY, J. 2010. Malaria Management: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Entomol.*, 55, 569-591.
- FALK, N., KAESTLI, M., QI, W., OTT, M., BAEA, K., CORTES, A. & BECK, H. P. 2009. Analysis of *Plasmodium falciparum* var genes expressed in children from Papua New Guinea. *J Infect Dis.*, 200, 347-56.
- FERREIRA, F. L., BOTA, D. P., BROSS, A., MELOT, C. & VINCENT, J. L. 2001. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA*, 286, 1754-8.
- FOREMAN, K. E., GLOVSKY, M. M., WARNER, R. L., HORVATH, S. J. & WARD, P. A. 1996. Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation*, 20, 1-9.
- FRANCISCETTI, I. M., SEYDEL, K. B. & MONTEIRO, R. Q. 2008. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation*, 15, 81-107.
- FREVERT, U., SINNIS, P., CERAMI, C., SHREFFLER, W., TAKACS, B. & NUSSENZWEIG, V. 1993. Malaria Circumsporozoite Protein Binds to Heparan Sulfate

- Proteoglycans Associated with the Surface Membrane of Hepatocytes. *J. Exp. Med.* , 177, 1287-1298.
- FRIED, M. & DUFFY, P. E. 1996. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*, 272, 1502-4.
- GARRAUD, O., MAHANTY, S. & PERRAUT, R. 2003 Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. *Trends in Immunology*, 24, 30-35.
- GETHING, P., ELYAZAR, I. R. F., MOYES, C. L., SMITH, D. S., BATTLE, K. E., GUERRA, C. A., PATIL, A. P., TATEM, A. J., HOWES, R. E., MYERS, M. F., GEORGE, D. B., HORBY, P., WERTHEIM, H. F. L., PRICE, R. N., BAIRD, I. M. K. & HAY, S. I. 2012. A Long Neglected World Malaria Map: *Plasmodium vivax* Endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis.*, 6, 1814.
- GIHA, H. A., NASR, A., EKSTRÖM, M., ISRAELSSON, E., ARAMBEPOLA, G., ARNOT, D., THEANDER, T. G., TROYE-BLOMBERG, M., BERZINS, K., TORNVALL, P. & ELGHAZALI, G. 2010. Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the C-Reactive Protein Gene (–286) with Susceptibility to *Plasmodium falciparum* Malaria. *M O L M E D* 16, 27-33.
- GOMES, A. P., VITORINO, R. R., COSTA, A. P., MENDONÇA, E. G., OLIVEIRA, M. G. A. & SIQUEIRA-BATISTA, R. R. 2011. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Rev Bras Ter Intensiva*, 23, 358-369.
- GOMES, R. N., DE ARAÚJO, E. F. & CARVALHO, F. 2007. Por que os homens buscam menos os serviços. *Cad. Saude Publica*, 23, 565-574.
- GROUX, H. & GYSIN, J. 1990. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol.* , 141, 529-42.
- GUPTA, S., SNOW, R. W., DONNELLY, C. A., KEVIN, M. & NEWBOLD, C. 1999. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nature medicine*, 5, 340-343.

- HALDAR, K. & MOHANDAS, N. 2009. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 87-93.
- HÄNSCHEID, T. & GROBUSCH, M. P. 2002. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *TRENDS in Parasitology*, 18.
- HANSON, J., ANSTEY, N. M., BIHARI, D., WHITE, N. J., DAY, N. D. & DONDORP, A. M. 2014. The fluid management of adults with severe malaria. *Critical Care* 18.
- HASSANPOUR, G., MOHEBALI, M., RAEISI, A., ABOLGHASEMI, H., ZERAATI, H., ALIPOUR, M., AZIZI, E. & KESHAVARZ, H. 2011. Detection of malaria infection in blood transfusion: a comparative study among real-time PCR, rapid diagnostic test and microscopy. *Parasitol Res.* , 108.
- HAY, S. I., SMITH, D. L. & SNOW, R. W. 2008. Measuring malaria endemicity from intense to interrupted transmission. *Lancet Infect Dis.* , 8, 369–78.
- HEDDINI, A., PETTERSSON, F., KAI, O., SHAFI, J., OBIERO, J., CHEN, Q., BARRAGAN, A., WAHLGREN, M. & MARSH, K. 2001. Fresh isolates from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors. *Infect Immun.*, 69, 5849-56.
- HENDRIKSEN, I. C. E., MTOVE, G., PEDRO, A. J., GOMES, E., SILAMUT, K., LEE, S. J., MWAMBULI, A., GESASE, S., REYBURN, H. & DAY, N. P. J. 2011. Evaluation of a PfHRP2 and a pLDH-based rapid diagnostic test for the diagnosis of severe malaria in 2 populations of African children. *Clinical infectious diseases*, 52, 1100-1107.
- HO, M., DAVIS, T. M. E., SILAMUT, K. & BUNNAG, D. 1991. Rosette formation of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes from patients with acute malaria. *INFECTION AND IMMUNITY*, 59, 2135-2139.
- HOWES, R. E., PATIL, A. P., ZIMMERMAN, P. A., WILLIAMS, T. N., PIEL, F. B., BARNADAS, C., WEATHERALL, D. J., NYANGIRI, O. A., BEALL, C. M., HAY, S. I., KABARIA, C. W., GEBREMEDHIN, A., MÉNARD, D. & GETHING, P. W. 2011.

The global distribution of the *Duffy* blood group. *NATURE COMMUNICATIONS*, 2, 266.

HURT, N., SMITH, T., TEUSCHER, T. & TANNER, M. 1994. Do high level of C-Reactive Protein in Tanzanian children indicate malaria morbidity *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, 1, 437-444.

HVIID, L. 2005. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta tropical*, 95, 270-275.

JADHAV, U., PATKAR, V. & KADAM, N. 2004. Thrombocytopenia in malaria—correlation with type and severity of malaria. *JAPI*, 52, 8.

JAKOBSEN, P. H., BATE, C. A., TAVERNE, J. & PLAYFAIR, J. H. 1995. Malaria: toxins, cytokines and disease. *Parasite Immunol.*, 17, 223-31.

JANSSENS, U., GRAF, C., GRAF, J., RADKE, P. W., KONIGS, B., KOCH, K. C., LEPPER, W., VOM DAHL, J. & HANRATH, P. 2000. Evaluation of the SOFA score: a single-center experience of a medical intensive care unit in 303 consecutive patients with predominantly cardiovascular disorders. Sequential Organ Failure Assessment. *Intensive Care Med.*, 26, 1037-45.

KAI, O. K. & ROBERTS, D. J. 2008. The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? *BMC Medicine*, 6.

KHADANGA, S., THATOI, P. K., MOHAPATRA, B. N., MOHAPATRA, N., MOHANTY, C. B. K. & KARUNA, T. 2014. Severe *Falciparum* Malaria—Difference in Mortality among Male and Nonpregnant Females. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8, MC01-MC04.

KIRCHGATTER, K. & PORTILLO, H. A. 2002. Association of severe noncerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequences lacking cysteine residues. *Mol Med.* , 8, 16-23.

KLOS, A., TENNER, A. J., JOHSWICH, K. O., AGER, R. R., REIS, E. S. & KOHL, J. 2009. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol.*, 46, 2753-66.

- KOCHAR, D. K., SINGH, P., AGARWAL, P., KOCHAR, S. K., POKHARNA, R. & SAREEN, P. K. 2003. Malarial hepatitis. *J Assoc Physicians India*, 51, 1069-72.
- KOH, K., CHEW, P. & KIYU, A. 2004. A retrospective study of malaria infections in an intensive care unit of a general hospital in Malaysia. *Singapore Med J.*, 45, 28-36.
- KRISHNAN, A. & KARNAD, D. R. 2003. Severe *falciparum* malaria: an important cause of multiple organ failure in Indian intensive care unit patients. *Crit Care Med.*, 31, 2278-84.
- KYRIACOUA, H., STONEB, G., CHALLIS, R., RAZAA, A., LYKEC, K., THERAD, M., KON', A. K., PLOWEC, C., ROWEA, J. & DOUMBOD, O. 2006. Differential var gene transcription in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with cerebral malaria compared to hiperparasitaemia. *Molecular & Biochemical Parasitology* 150, 211-218.
- LALLOO, D. G., TREVETT, A. J., PAUL, M., KORINHONA, A., LAURENSEN, I. F., MAPAO, J., NWOKOLO, N., DANGA-CHRISTIAN, B., BLACK, J. & SAWERI, A. 1996. Severe and complicated *falciparum* malaria in Melanesian adults in Papua New Guinea. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 55, 119-124.
- LANGHORNE, J., GOODIER, M., BEHR, C. & DUBOIS, P. 1992. Is there a role for gamma delta T cells in malaria? *Immunol Today*, 13, 298-300.
- LARKIN, D., DE LAAT, B., JENKINS, P. V., BUNN, J., CRAIG, A. G., TERRAUBE, V., PRESTON, R. J., DONKOR, C., GRAU, G. E., VAN MOURIK, J. A. & O'DONNELL, J. S. 2009. Severe *Plasmodium falciparum* malaria is associated with circulating ultra-large von Willebrand multimers and ADAMTS13 inhibition. *PLoS Pathog.*, 5, e1000349.
- LEGORRETA-HERRERA, M. & SÁNCHEZ-CRUZ, P. 1999. La respuesta inmune celular contra el *Plasmodium*: agente etiológico da malaria. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 2, 3-8.
- LOVEGROVE, F. E., TANGPUKDEE, N., OPOKA, R. O., LAFFERTY, E. I., RAJWANS, N., HAWKES, M., KRUDSOOD, S., LOOAREESUWAN, S., JOHN, C. C., LILES, W. C. & KAIN, K. C. 2009. Serum angiopoietin-1 and -2 levels discriminate

cerebral malaria from uncomplicated malaria and predict clinical outcome in African children. *PLoS One*, 4, e4912.

MACKINTOSH, C. L., BEESON, J. G. & MARSH, K. 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in parasitology*, 20, 597-603.

MACPHERSON, G. G., WARRELL, M. J., WHITE, N. J., LOOAREESUWAN, S. & WARRELL, D. A. 1985. Human cerebral malaria a quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol.* , 119, 385-401.

MAITLAND, K., PAMBA, A., FEGAN, G., NJUGUNA, P., NADEL, S., NEWTON, C. R. J. C. & LOWE, B. 2005. Perturbations in electrolyte levels in Kenyan children with severe malaria complicated by acidosis. *Clinical infectious diseases*, 40, 9-16.

MARCHIAFAVA, E. 1884. On summer-autumn malarial fevers *In*: THOMPSON, D. J. (ed.) 1 ed.

MARKIEWSKI, M. M., NILSSON, B., EKDAHL, K. N., MOLLNES, T. E. & LAMBRIS, J. D. 2007. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol.*, 28, 184-92.

MARKS, M., GUPTA-WRIGHT, A., DOHERTY, J. F., SINGER, M. & WALKER, D. 2014. Managing malaria in the intensive care unit. *Br J Anaesth.*, 113, 910-21.

MARKS, M. E., ARMSTRONG, M., SUVARI, M. M., BATSON, S., WHITTY, C. J. M., CHIODINI, P. L., BELLINGHAN, G. & DOHERTY, J. F. 2013. Severe imported *falciparum* malaria among adults requiring intensive care: a retrospective study at the hospital for tropical diseases, London. *BMC infectious diseases*, 13, 118.

MARSH, K., FORSTER, D., WARUIRU, C., MWANGI, I., WINSTANLEY, M., MARSH, V., NEWTON, C., WINSTANLEY, P., WARN, P., PESHU, N. & ET AL. 1995. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med.*, 332, 1399-404.

MEDICINE, A. C. O. C. P. S. O. C. C. 1992. Consensus Conference: definitions for Sepsis and Multiple Organ Failure. *Crit Care Med.*, 20, 864-874.

- METNITZ, P. G., KRENN, C. G., STELTZER, H., LANG, T., PLODER, J., LENZ, K., LE GALL, J. R. & DRUML, W. 2002. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. *Crit Care Med.*, 30, 2051-8.
- MIBEI, E. K., OTIENO, W. O., ORAGO, A. S. S. & STOUTE, J. A. 2008. Distinct pattern of class and subclass antibodies in immune complexes of children with cerebral malaria and severe malarial anaemia. *Parasite immunology*, 30, 334-341.
- MILLER, L. H., BARUCH, D. I., MARSH, K. & DOUMBO, O. K. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415, 673-679.
- MILLER, L. H., MCAULIFFE, F. M. & JOHNSON, J. G. 1979. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Prog Clin Biol Res.*, 30, 497-502.
- MINSA 2006. Plano Nacional de Controlo da Malária. Governo de Angola.
- MINSA 2013. Relatório Anual de Actividades e Contas. Governo de Angola.
- MISHRA, S. K., MOHAPATRA, S. & MOHANTY, S. 2003. Jaundice in *falciparum* malaria. *JACM*, 4, 12-13.
- MISHRA, S. K., PANIGRAHI, P., MISHRA, R. & MOHANTY, S. 2007. Prediction of outcome in adults with severe *falciparum* malaria: a new scoring system. *Malaria Journal*, 6, 6-24.
- MOODY, A. 2002. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.*, 15, 66-78.
- MUHLFELDER, T. W., NIEMETZ, J., KREUTZER, D., BEEBE, D., WARD, P. A. & ROSENFELD, S. I. 1979. C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity: a link between complement and coagulation. *J Clin Invest.*, 63, 147-50.
- NARSARIA, N., MOHANTY, C., DAS, B. K., MISHRA, S. P. & PRASAD, R. 2011. Oxidative stress in children with severe malaria. *Journal of tropical pediatrics*, fmr043.

- NIMRI, L. F. & LANNERS, H. N. 2014. Glomerulonephropathies in *Plasmodium* inui-infected rhesus monkey: a primate model and possible applications for human quartan malaria. *Parasitology* 141, 1638-1645.
- NZATUZOLA, J. B. L. 2012. Crescimento da População em Angola: “Um olhar sobre a situação e dinâmica populacional da cidade de Luanda”. *Revista de Estudos Demográficos*, 49.
- OCHOLA, L. B., VOUNATSOU, P., SMITH, T., MABASO, M. L. H. & NEWTON, C. R. J. 2006. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard *Lancet Infect Dis.* , 6.
- OFFEDDU, V., THATHY, V., MARSH, K. & MATUSCHEWSKI, K. 2012. Naturally acquired immune responses against *Plasmodium falciparum* sporozoites and liver infection. *International Journal for Parasitology*, 42.
- OLIVEIRA, S. 2012. Modos de vida da pobreza em Angola. *Revista Angolana de Sociologia*, 125-134.
- OLLIARO, P. 2008. Mortality associated with severe *Plasmodium falciparum* malaria increases with age. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 158-160.
- ONG'ECHA, J. M., LAL, A. A., TERLOUW, D. J., TER KUILE, F. O., KARIUKI, S. K., UDHAYAKUMAR, V., ORAGO, A. S., HIGHTOWER, A. W., NAHLEN, B. L. & SHI, Y. P. 2003. Association of interferon-gamma responses to pre-erythrocytic stage vaccine candidate antigens of *Plasmodium falciparum* in young Kenyan children with improved hemoglobin levels. *Am J Trop Med Hyg.*, 68, 590-7.
- OWUOR, B. O., ODHIAMBO, C. O., OTIENO, W. O., ADHIAMBO, C., MAKAWITI, D. W. & STOUTE, J. A. 2008. Reduced immune complex binding capacity and increased complement susceptibility of red cells from children with severe malaria-associated anemia. *Mol Med.*, 14, 89-97.
- PERKINS, D. J., WERE, T., DAVENPORT, G. C., KEMPAIAH, P., HITTNER, J. B. & ONG'ECHA, J. M. 2011. Severe Malarial Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, 7, 1427-1442.

- PHILLIPS, A., BASSETT, P., ZEKI, S., NEWMAN, S. & PASVOL, G. 2009. Risk factors for severe disease in adults with *falciparum* malaria. *Clin Infect Dis.*, 48, 871-8.
- PIGOTT, D. M., ATUN, R., MOYES, C. L., HAY, S. I. & GETHING, P. W. 2012. Funding for malaria control 2006–2010 : a comprehensive global assessment. *Malar J.*, 11, 246.
- PLANCHE, T. & KRISHNA, S. 2006. Severe malaria: metabolic complications. *Current molecular medicine*, 6, 141-153.
- PNS 2010. Política Nacional de Saúde. In: NOVENBRO, D. P. N. D. D. (ed.). Luanda, Angola: Diário da República I Série – Nº 222.
- RAJAHRAM, G. S., BARBER, B. E., WILLIAM, T., MENON, J., ANSTEY, N. M. & W YEO, T. 2012. Deaths due to *Plasmodium knowlesi* malaria in Sabah, Malaysia: association with reporting as *Plasmodium malariae* and delayed parenteral artesunate. *Malaria Journal* 11, 284.
- RAMASAMY, R. 2014. Zoonotic malaria – global overview and research and policy needs. *Frontiers of Public Health*, 2 1.
- RIGANTI, M., PONGPONRATN, E., TEGOSHI, T., LOOAREESUWAN, S., PUNPOOWONG, B. & AIKAWA, M. 1990. Human cerebral malaria in Thailand: a clinico-pathological correlation. *Immunol Lett.*, 25, 199-205.
- RINGWALD, P., PEYRON, F., LEPERS, J. P., RABARISON, P., RAKOTOMALALA, C., RAZANAMPARANY, M., RABODONIRINA, M., ROUX, J. & LE BRAS, J. 1993. Parasite Virulence Factors during *Falciparum* Malaria: Rosetting, Cytoadherence, and Modulation of Cytoadheren by Cytokines. *INFECTION AND IMMUNITY*, 61, 5198-5204.
- ROGERSON, S. J., POLLINA, E., GETACHEW, A., TADESSE, E., LEMA, V. M. & MOLYNEUX, M. E. 2003. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg.*, 68, 115-9.

- ROGIER, C., GERARDIN, P. & IMBERT, P. 2004. Thrombocytopenia is predictive of lethality in severe childhood falciparum malaria. *Archives of disease in childhood*, 89, 795-796.
- ROTTMANN, M., LAVSTSEN, T., MUGASA, J. P., KAESTLI, M., JENSEN, A. T., MÜLLER, D., THEANDER, T. G. & BECK, H. P. 2006. Differential expression of var gene groups is associated with morbidity caused by *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian children. *Infect Immun.*, 74, 3904-11.
- ROVIRA-VALLBONA, E., MONCUNILL, G., BASSAT, Q., AGUILAR, R., MACHEVO, S., PUYOL, L., QUINTÓ, L., MENÉNDEZ, C., CHITNIS, C. E. & ALONSO, P. L. 2012. Low antibodies against *Plasmodium falciparum* and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children: a case-control study. *Malar J.*, 11, 181-207.
- ROWE, J. A., MOULDS, J. M., NEWBOLD, C. I. & MILLER, L. H. 1997. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, 388, 292-5.
- ROWE, J. A., SHAFI, J., KAI, O. K., MARSH, K. & RAZA, A. 2002. Nonimmune IgM, but not IgG binds to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66, 692-699.
- SARKAR, P. K., AHLUWALIA, G., VIJAYAN, V. K. & TALWAR, A. 2010. Critical care aspects of malaria. *Journal of Intensive Care Medicine*, 25, 93-103.
- SCHOFIELD, S., TEPPER, M. & TUCK, J. J. 2007. Malaria risk assessment and preventive recommendations: a new approach for the Canadian military. *Mil Med.*, 172, 1250-3.
- SEYDEL, K. B., MILNER, D. A., JR., KAMIZA, S. B., MOLYNEUX, M. E. & TAYLOR, T. E. 2006. The distribution and intensity of parasite sequestration in comatose Malawian children. *J Infect Dis.*, 194, 208-5.

- SHI, Y. P., SAYED, U., QARI, S. H., ROBERTS, J. M., UDHAYAKUMAR, V., OLOO, A. J., HAWLEY, W. A., KASLOW, D. C., NAHLEN, B. L. & LAL, A. A. 1996. Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infect Immun.*, 64, 2716-23.
- SINKA, M. E., BANGS, M. J., MANGUIN, S., COETZEE, M., MBOGO, C. M., HEMINGWAY, J., PATIL, A. P., TEMPERLEY, W. H., GETTING, P. W., KABARIA, C. W., OKARA, R. M., BOECKEL, T. V., GODFRAY, H. C. J., HARBACH, R. E. & HAY, S. I. 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors* 3, 117.
- STEKETEE, R. W. & CAMPBELL, C. C. 2010. Impact of national malaria control scale-up programmes in Africa: magnitude and attribution of effects. *Malaria Journal* 9, 299.
- STORM, J. & CRAIG, A. G. 2014. Pathogenesis of cerebral malaria—inflammation and cytoadherence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4.
- SUBRAMANIAM, K. S., SKINNER, J., IVAN, E., MUTIMURA, E., KIM, R. S., FEINTUCH, C. M., PORTUGAL, S., ANASTOS, K., CROMPTON, P. D. & DAILY, J. P. 2015. HIV Malaria Co-Infection Is Associated with Atypical Memory B Cell Expansion and a Reduced Antibody Response to a Broad Array of *Plasmodium falciparum* Antigens in Rwandan Adults. *PLOS ONE*
- SUSOMBOON, P., MANEERAT, Y., DEKUMYOY, P., KALAMBAHETI, T., IWAGAMI, M., KOMAKI-YASUDA, K., KAWAZU, S., TANGPUKDEE, N., LOOAREESUWAN, S. & KANO, S. 2006. Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitol Int.*, 55, 107-12.
- TAYLOR-ROBINSON, A. W., PHILLIPS, R. S., SEVERN, A., MONCADA, S. & LIEW, F. Y. 1993. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science*, 260, 1931-4.

- TAYLOR, W. R. J., CAÑON, V. & WHITE, N. J. 2006. Pulmonary manifestations of malaria. *Treatments in respiratory medicine*, 5, 419-428.
- TEASDALE, G. & JENNETT, B. 1974. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*, 2, 81-4.
- TRAMPUZ, A., JEREB, M., MUZLOVIC, I. & PRABHU, R. M. 2003. Clinical review: Severe malaria. *CRITICAL CARE-LONDON*, 7, 315-323.
- TRANG, T. T. M., PHU, N. H., VINH, H., HIEN, T. T., CUONG, B. M., CHAU, T. T. H., MAI, N. T. H., WALLER, D. J. & WHITE, N. J. 1992. Acute renal failure in patients with severe *falciparum* malaria. *Clinical Infectious Diseases*, 15, 874-880.
- TUAN, M. T., SAMAL, B., KIRKNESS, E. & CROMPTON, P. D. 2012 Systems immunology of human malaria. *Trends Parasitol.*, 28(6), 248-257.
- TURRINI, F., GINSBURG, H., BUSSOLINO, F., PESCARMONA, G. P., SERRA, M. V. & ARESE, P. 1992. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood*, 80, 801-8.
- VÁSQUEZ, A. M. & TOBÓN, A. 2012. Mecanismos de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Biomédica*, 32.
- VÁSQUEZ, A. M. & TOBÓN, A. 2012. Pathogenic mechanisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *Biomedica*, 32, 106-120.
- VERSIANI, F. G., ALMEIDA, M. E., MELO, G. C., VERSIANI, F. O., ORLANDI, P. P., MARIÚBA, L. A., SOARES, L. A., SOUZA, L. P., BALIEIRO, A. A. S. & MONTEIRO, W. M. 2013. High levels of IgG3 anti ICB2-5 in *Plasmodium vivax*-infected individuals who did not develop symptoms. *Malaria Journal Sample*, 12.
- WAITUMBI, J. N., OPOLLO, M. O., MUGA, R. O., MISORE, A. O. & STOUTE, J. A. 2000. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *plasmodium falciparum* anemia. *Blood*, 95, 1481-6.

WASSMER, S. C., COMBES, V. & GRAU, G. E. 2003. Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion. *Ann N Y Acad Sci.*, 992, 30-8.

WHO 2011. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 3 (2010-2011). *Global Malaria Programme*. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

WHO. 2012. Severe Malaria_WHO 2012.

WHO 2012. World Malaria Report 2012. *Change in malaria incidence and mortality*. Geneva, Switzerland: WHO.

WHO 2014. *Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: Conclusions and recommendations of March 2013 meeting World malaria report 2013* World Health Organization.

WHO 2014. World Malaria Report 2014. *The public health challenge posed by malaria*. Geneva-Switzerland: WHO.

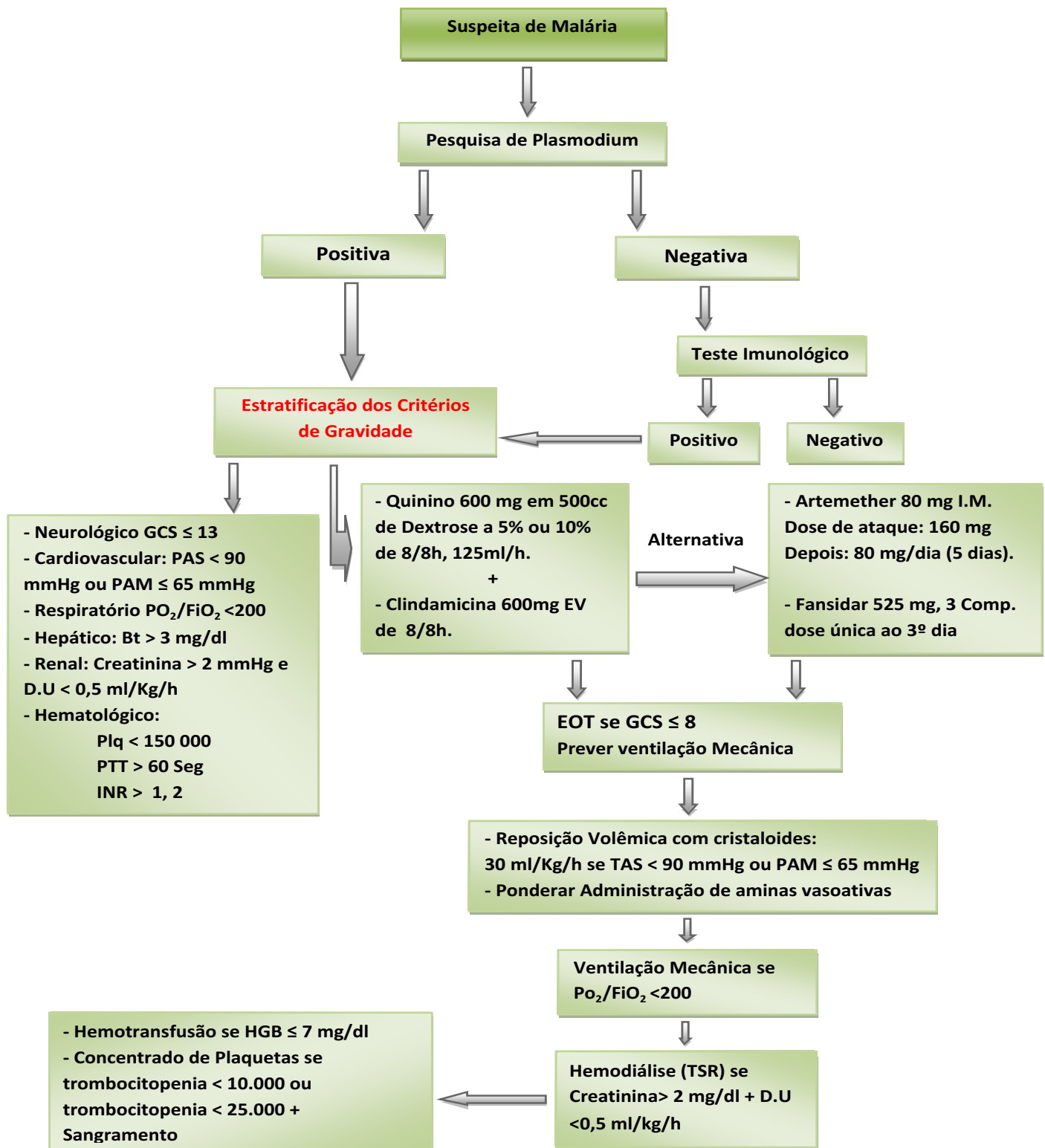
WILSON, M. L. 2013. Laboratory Diagnosis of Malaria Conventional and Rapid Diagnostic Methods. *Arch Pathol Lab Med.* .

WOJTA, J., KAUN, C., ZORN, G., GHANNADAN, M., HAUSWIRTH, A. W., SPERR, W. R., FRITSCH, G., PRINTZ, D., BINDER, B. R., SCHATZL, G., ZWIRNER, J., MAURER, G., HUBER, K. & VALENT, P. 2002. C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood*, 100, 517-23.

ZHOU, J., LUDLOW, L. E., HASANG, W., ROGERSON, S. J. & JAWOROWSKI, A. 2012. Opsonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and enhances inflammatory cytokine secretion by human macrophages. *Malaria Journal* 11, 343.

VIII. ANEXOS


ANEXO 1: Protocolo para diagnóstico e tratamento dos doentes com malária grave da SCI – Hospital Américo Boavida em Luanda – Angola





Anexo 2 –Primeira tentativa de análise de clusters em função das disfunções orgânicas.

Das 6 disfunções orgânicas estudadas, resultaram apenas 2+1 clusters pelo algoritmo TwoStep Analysis. Verificou-se que as últimas duas disfunções orgânicas não apresentavam poder discriminante (fundo cinza)). As restantes 4 disfunções foram usadas em exclusividade na segunda tentativa de classificação, com o intuito de reduzir o ruído de fundo.

Clusters

Input (Predictor) Importance

1,0 0,8 0,6 0,4 0,2 0,0

Cluster	1	2
Label		
Description		
Size	 51,9% (41)	 48,1% (38)
Inputs	REN Sim (100,0%)	REN Não (73,7%)
	HEP Sim (100,0%)	HEP Não (60,5%)
	ARDS Não (70,7%)	ARDS Não (100,0%)
	NEU Sim (85,4%)	NEU Sim (100,0%)
	CAR (100,0%)	CAR (100,0%)
	HEM x (100,0%)	HEM x (100,0%)

ANEXO 3 - Análise de regressão linear aplicada entre o SOFA *score* médio e o MAS *score* para os doentes do presente estudo

Regression

[DataSet1] D:\HF\Lina_Antunes\Resultados_Malária_00003.sav

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
SOFA	8,92	3,815	101
Score MAS	5,37	2,262	101

Correlations

		SOFA	Score MAS
Pearson Correlation	SOFA	1,000	,498
	Score MAS	,498	1,000
Sig. (1-tailed)	SOFA	.	,000
	Score MAS	,000	.
N	SOFA	101	101
	Score MAS	101	101

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Score MAS ^b	.	Enter

a. Dependent Variable: SOFA

b. All requested variables entered.

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics	
					R Square Change	F Change
1	,498 ^a	,248	,241	3,324	,248	32,706

Model Summary^b

Model	Change Statistics			Durbin-Watson
	df1	df2	Sig. F Change	
1	1	99	,000	1,592

a. Predictors: (Constant), Score MAS

b. Dependent Variable: SOFA

ANEXO 4 - Análise ANOVA aplicada à Probabilidade de morte estimada pelo SOF A_{max} em relação aos 6+1 *clusters* obtidos com base nas 4 disfunções de órgãos discriminantes.

Oneway

[DataSet1] D:\HF\Lina_Antunes\Resultados_Malária_00003.sav

Descriptives

SOF A_{max} PM

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence ...
					Lower Bound
Outlier Cluster	7	48,1429	33,62255	12,70813	17,0472
1	16	40,2500	23,68544	5,92136	27,6289
2	12	33,0000	30,01515	8,66463	13,9293
3	17	22,4706	14,58217	3,53670	14,9731
4	12	38,9167	27,59927	7,96722	21,3809
5	24	75,2917	26,52231	5,41384	64,0923
6	13	76,3846	24,89825	6,90553	61,3388
Total	101	49,7624	32,29153	3,21313	43,3876
Model					
Fixed Effects			25,37109	2,52452	44,7499
Random Effects				9,01927	27,6930

Descriptives

SOF A_{max} PM

	95% Confidence ...	Minimum	Maximum	Between-Component Variance
	Upper Bound			
Outlier Cluster	79,2385	20,00	95,00	
1	52,8711	20,00	95,00	
2	52,0707	7,00	95,00	
3	29,9680	7,00	50,00	
4	56,4524	20,00	95,00	
5	86,4911	33,00	95,00	
6	91,4305	33,00	95,00	
Total	56,1371	7,00	95,00	
Model				
Fixed Effects	54,7749			
Random Effects	71,8317			470,07408

Test of Homogeneity of Variances

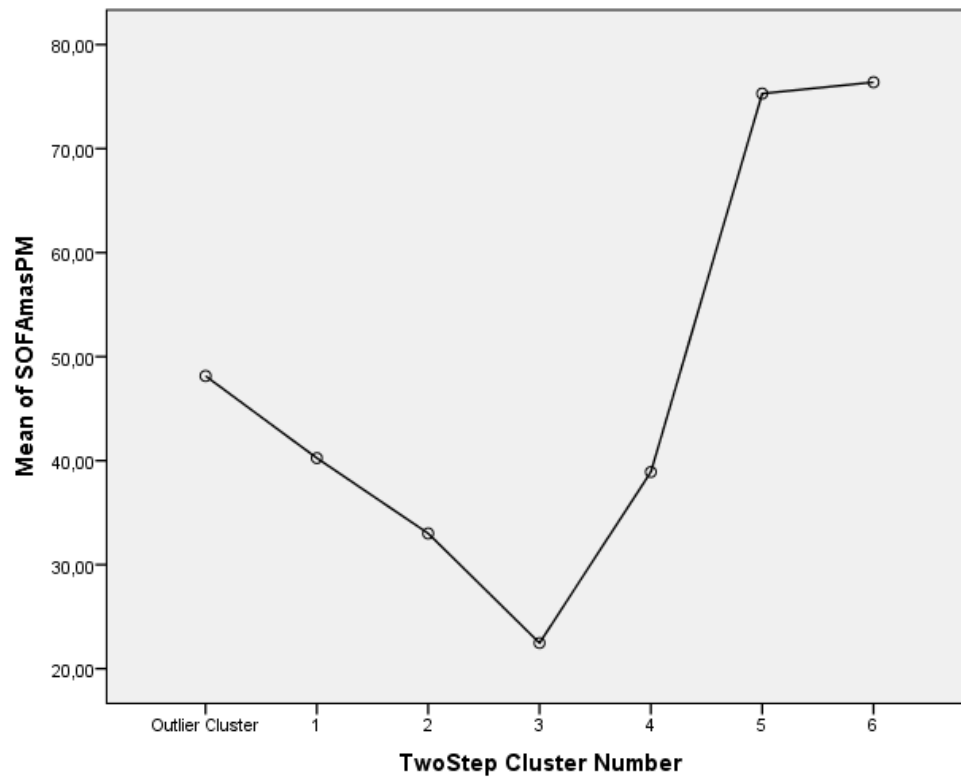
SOF A_{max} PM

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,219	6	94	,048

ANOVA

SOF A_{max} PM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	43767,253	6	7294,542	11,332	,000
Within Groups	60507,044	94	643,692		
Total	104274,297	100			



ANEXO 5 - Correlação entre os anticorpos totais anti-*Plasmodium spp* e anti-*P. falciparum* aplicada aos doseamentos efetuados aos doentes do presente estudo

Correlations

[DataSet2] D:\HF\Lina_Antunes\Resultados_Malária_00003.sav

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
IgGtotalspp	7,6620	6,61327	100
IgGP_falc	3,9057	2,26962	98

Correlations

		IgGtotalspp	IgGP_falc
IgGtotalspp	Pearson Correlation	1	,724**
	Sig. (2-tailed)		,000
	Sum of Squares and Cross-products	4329,805	1052,120
	Covariance	43,735	10,847
	N	100	98
IgGP_falc	Pearson Correlation	,724**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	Sum of Squares and Cross-products	1052,120	499,665
	Covariance	10,847	5,151
	N	98	98

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

ANEXO 6 - População serologicamente negativa para anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.*

Paciente ID	Anticorpos totais anti- <i>Plasmodium spp</i>	Anticorpos IgG anti- <i>P. falciparum</i>	Teste rápido
A1	0,36	1,21	<i>P. falciparum</i>
A3	0,57	2,81	<i>P. falciparum</i>
A10	0,36	1,23	<i>P. falciparum</i>
A16	0,46	1,95	Negativo
A20	0,87	5,17	<i>P. falciparum</i> <i>P. malariae</i>
A21	0,39	19,37	<i>P. falciparum</i>
A22	0,45	33,75	<i>P. falciparum</i>
A26	0,96	26,00	<i>P. falciparum</i>
A32	0,35	16,09	<i>P. falciparum</i>
A34	0,36	23,20	<i>P. falciparum</i>
A35	0,39	18,43	<i>P. falciparum</i>
A38	0,97	24,84	<i>P. falciparum</i>
A42	0,57	24,99	<i>P. falciparum</i>
A48	0,40	45,66	<i>P. falciparum</i>
A52	0,79	24,41	<i>P. falciparum</i>
A53	0,32	17,74	<i>P. falciparum</i>
A54	0,34	16,39	<i>P. falciparum</i>
A59	0,53	13,51	Negativo
A66	0,42	16,63	<i>P. falciparum</i>
A67	0,83	33,25	<i>P. falciparum</i>
A69	0,63	16,27	<i>P. falciparum</i>
A70	0,79	25,87	<i>P. falciparum</i>
A80	0,77	19,47	<i>P. falciparum</i>

ANEXO 7 - Tabela 2: População serologicamente positiva para anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.*

Paciente ID	Anticorpos totais anti-<i>Plasmodium spp</i>	Anticorpos IgG anti-<i>P. falciparum</i>	Teste rápido
A2	16,96	6,44	<i>P. falciparum</i>
A4	14,11	2,82	<i>P. falciparum</i>
A5	12,87	3,34	<i>P. falciparum</i>
A6	5,60	4,86	<i>P. falciparum</i>
A7	18,27	6,44	<i>P. falciparum</i>
A8	1,81	1,88	Negativo
A9	2,45	1,99	<i>P. falciparum</i>
A11	12,49	3,72	<i>P. falciparum</i>
A12	2,81	1,46	<i>P. falciparum</i>
A13	20,07	5,42	<i>P. falciparum</i>
A14	16,37	5,21	<i>P. falciparum</i>
A15	15,61	5,26	<i>P. falciparum</i>
A17	16,50	5,17	<i>P. falciparum</i>
A18	8,35	2,95	<i>P. falciparum</i>
A23	12,73	54,27	<i>P. falciparum</i>
A24	7,12	37,79	Negativo
A25	1,29	28,47	<i>P. falciparum</i>
A27	17,00	76,63	<i>P. falciparum</i>
A28	11,99	46,25	<i>P. falciparum</i>
A29	10,54	37,52	<i>P. falciparum</i>
A30	16,25	58,66	<i>P. falciparum</i>
A31	16,60	63,72	<i>P. falciparum</i>
A33	1,55	31,11	<i>P. falciparum</i>

Paciente ID	Anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp	Anticorpos IgG anti- <i>P. falciparum</i>	Teste rápido
A36	1,10	26,75	Negativo
A37	17,29	53,97	<i>P. falciparum</i>
A39	7,20	15,46	Negativo
A40	14,90	61,66	<i>P. falciparum</i>
A41	12,10	23,66	Negativo
A43	10,73	38,10	<i>P. falciparum</i>
A44	8,60	50,97	<i>P. falciparum</i>
A45	12,86	68,21	<i>P. falciparum</i>
A46	2,58	19,79	Negativo
A47	10,27	29,92	<i>P. falciparum</i>
A49	10,86	59,74	<i>P. falciparum</i>
A50	11,02	75,75	<i>P. falciparum</i>
A51	12,62	72,64	<i>P. falciparum</i>
A55	2,69	48,54	<i>P. falciparum</i>
A56	18,62	61,08	<i>P. falciparum</i>
A57	3,05	31,20	<i>P. falciparum</i>
A58	16,60	51,98	<i>P. falciparum</i>
A60	14,97	82,55	<i>P. falciparum</i>
A61	10,17	77,88	Negativo
A62	8,38	30,87	<i>P. falciparum</i>
A63	8,86	32,50	<i>P. falciparum</i>
A64	13,69	60,50	<i>P. falciparum</i>
A65	1,24	13,02	<i>P. falciparum</i>
A68	21,55	19,27	<i>P. falciparum</i>
A71	7,10	10,23	Negativo
A72	3,21	13,98	<i>P. falciparum</i>

Paciente ID	Anticorpos totais anti-<i>Plasmodium</i> spp	Anticorpos IgG anti-<i>P. falciparum</i>	Teste rápido
A73	8,73	40,15	<i>P. falciparum</i>
A74	15,55	48,92	<i>P. falciparum</i>
A75	5,03	14,89	<i>P. falciparum</i>
A76	9,53	53,00	<i>P. falciparum</i>
A77	10,03	66,04	Negativo
A78	8,59	32,60	Negativo
A79	16,40	52,81	<i>P. falciparum</i>

ANEXO 8 - Tabela 3: Determinação da proteína C reativa nas amostras de sangue dos indivíduos com malária grave.

AMOSTRA	ABS-1	ABS-2	MÉDIA	CONCENTRAÇÃO
1	0,581	0,582	0,582	5872,2
2	0,486	0,462	0,474	4677,8
3	0,983	0,88	0,932	9761,1
4	1,023	0,856	0,940	9850,0
5	0,795	0,791	0,793	8222,2
6	0,723	0,784	0,754	7783,3
7	0,749	0,854	0,802	8316,7
8	0,714	0,604	0,659	6733,3
9	0,912	0,841	0,877	9150,0
10	0,882	0,835	0,859	8950,0
11	0,908	0,933	0,921	9638,9
12	0,842	0,858	0,850	8855,6
13	0,831	0,709	0,770	7966,7
14	0,713	0,803	0,758	7833,3
15	0,708	0,789	0,749	7727,8
16	0,671	0,733	0,702	7211,1
17	0,89	0,902	0,896	9366,7
18	0,837	0,886	0,862	8983,3
19				
20	0,832	0,887	0,860	8961,1
21	0,779	0,683	0,731	7533,3
22	0,743	0,733	0,738	7611,1
23	0,681	0,684	0,683	6994,4
24	0,701	0,757	0,729	7511,1
25	0,838	0,896	0,867	9044,4
26	0,823	0,688	0,756	7805,6
27	0,77	0,749	0,760	7850,0
28	0,814	0,773	0,794	8227,8
29	0,664	0,608	0,636	6477,8
30	0,726	0,629	0,678	6938,9
31	0,57	0,588	0,579	5844,4
32	0,623	0,662	0,643	6550,0
33	0,717	0,657	0,687	7044,4
34	0,742	0,749	0,746	7694,4
35	0,625	0,598	0,612	6205,6
36	0,619	0,71	0,665	6794,4
37	0,768	0,724	0,746	7700,0
38	0,446	0,405	0,426	4138,9
39	0,518	0,497	0,508	5050,0
40	0,844	0,835	0,840	8738,9

AMOSTRA	ABS-1	ABS-2	MÉDIA	CONCENTRAÇÃO
41	0,117	0,107	0,112	655,6
42	0,747	0,725	0,736	7588,9
43	0,598	0,6	0,599	6066,7
44	0,701	0,637	0,669	6844,4
45	0,676	0,676	0,676	6922,2
46	0,671	0,619	0,645	6577,8
47	0,709	0,725	0,717	7377,8
48	0,659	0,692	0,676	6916,7
49	0,638	0,669	0,654	6672,2
50	0,651	0,617	0,634	6455,6
51	0,634	0,649	0,642	6538,9
52	0,707	0,725	0,716	7366,7
53	0,496	0,503	0,500	4961,1
54	0,571	0,581	0,576	5811,1
55	0,682	0,636	0,659	6733,3
56	0,587	0,657	0,622	6322,2
57	0,615	0,553	0,584	5900,0
58	0,606	0,56	0,583	5888,9
59	0,499	0,475	0,487	4822,2
60	0,66	0,637	0,649	6616,7
61	0,585	0,61	0,598	6050,0
62	0,507	0,543	0,525	5244,4
63	0,637	0,647	0,642	6544,4
64	0,596	0,593	0,595	6016,7
65	0,525	0,526	0,526	5250,0
66	0,51	0,547	0,529	5283,3
67	0,585	0,512	0,549	5505,6
68	0,554	0,514	0,534	5344,4
69	0,545	0,619	0,582	5877,8
70	0,561	0,596	0,579	5838,9
71	0,579	0,585	0,582	5877,8
72	0,562	0,599	0,581	5861,1
73	0,598	0,527	0,563	5661,1
74	0,526	0,547	0,537	5372,2
75	0,547	0,564	0,556	5583,3
76	0,502	0,508	0,505	5022,2
77	0,55	0,596	0,573	5777,8
78	0,57	0,566	0,568	5722,2
79	0,606	0,66	0,633	6444,4
80	0,569	0,559	0,564	5677,8
81	0,524	0,494	0,509	5066,7
82	0,547	0,449	0,498	4944,4
83	0,534	0,473	0,504	5005,6
84	0,531	0,492	0,512	5094,4
85	0,732	0,78	0,756	7811,1

AMOSTRA	ABS-1	ABS-2	MÉDIA	CONCENTRAÇÃO
86	0,633	0,547	0,590	5966,7
87	0,63	0,587	0,609	6172,2
88	0,359	0,321	0,340	3188,9
89	0,639	0,644	0,642	6538,9
90	0,564	0,553	0,559	5616,7
91	0,693	0,683	0,688	7055,6
92	0,682	0,689	0,686	7027,8
93	0,607	0,627	0,617	6266,7
94	0,677	0,653	0,665	6800,0
95	0,372	0,387	0,380	3627,8
96	0,497	0,549	0,523	5222,2
97	0,494	0,53	0,512	5100,0
98	0,62	0,526	0,573	5777,8
99	0,477	0,455	0,466	4588,9
100	0,381	0,406	0,394	3783,3
101	0,426	0,404	0,415	4022,2
102	0,575	0,664	0,620	6294,4

ABS: absorbância, concentração em pg/mL.

ANEXO 9 - Tabela 4: Determinação da proteína C5a nas amostras de sangue dos indivíduos com malária grave.

AMOSTRA	ABS-1	ABS-2	MÉDIA	CONCENTRAÇÃO
1	0,437	0,408	0,423	2008,0
2	0,194	0,194	0,194	865,5
3	0,331	0,362	0,347	1628,0
4	0,536	0,526	0,531	2550,5
5	0,582	0,557	0,570	2743,0
6	0,59	0,549	0,570	2743,0
7	0,471	0,438	0,455	2168,0
8	0,281	0,283	0,282	1305,5
9	0,207	0,221	0,214	965,5
10	0,454	0,457	0,456	2173,0
11	0,345	0,353	0,349	1640,5
12	0,306	0,244	0,275	1270,5
13	0,791	0,759	0,775	3770,5
14	0,256	0,235	0,246	1123,0
15	0,516	0,464	0,490	2345,5
16	0,764	0,688	0,726	3525,5
17	0,355	0,337	0,346	1625,5
18	0,297	0,263	0,280	1295,5
19				
20	0,246	0,238	0,242	1105,5
21	0,669	0,652	0,661	3198,0
22	0,424	0,393	0,409	1938,0
23	0,392	0,328	0,360	1695,5
24	0,451	0,381	0,416	1975,5
25	0,26	0,241	0,251	1148,0
26	0,489	0,393	0,441	2100,5
27	0,401	0,397	0,399	1890,5
28	0,27	0,194	0,232	1055,5
29	0,199	0,182	0,191	848,0
30	0,237	0,246	0,242	1103,0
31	0,076	0,074	0,075	270,5
32	0,299	0,282	0,291	1348,0
33	0,263	0,195	0,229	1040,5
34	0,161	0,148	0,155	668,0
35	0,235	0,22	0,228	1033,0
36	0,183	0,175	0,179	790,5
37	0,452	0,482	0,467	2230,5
38	0,136	0,133	0,135	568,0
39	0,577	0,536	0,557	2678,0
40	0,798	0,805	0,802	3903,0

AMOSTRA	ABS-1	ABS-2	MÉDIA	CONCENTRAÇÃO
41	0,289	0,286	0,288	1333,0
42	0,214	0,212	0,213	960,5
43	0,234	0,216	0,225	1020,5
44	0,489	0,477	0,483	2310,5
45	0,204	0,2	0,202	905,5
46	0,283	0,28	0,282	1303,0
47	0,348	0,344	0,346	1625,5
48	0,423	0,403	0,413	1960,5
49	0,335	0,313	0,324	1515,5
50	0,28	0,254	0,267	1230,5
51	0,303	0,292	0,298	1383,0
52	0,289	0,282	0,286	1323,0
53	0,416	0,389	0,403	1908,0
54	0,574	0,541	0,558	2683,0
55	0,22	0,213	0,217	978,0
56	0,341	0,334	0,338	1583,0
57	0,449	0,47	0,460	2193,0
58	0,37	0,351	0,361	1698,0
59	0,317	0,306	0,312	1453,0
60	0,297	0,268	0,283	1308,0
61	0,411	0,416	0,414	1963,0
62	0,211	0,217	0,214	965,5
63	0,348	0,389	0,369	1738,0
64	0,246	0,237	0,242	1103,0
65	0,363	0,355	0,359	1690,5
66	0,175	0,156	0,166	723,0
67	0,321	0,3	0,311	1448,0
68	0,101	0,101	0,101	400,5
69	0,439	0,422	0,431	2048,0
70	0,267	0,312	0,290	1343,0
71	0,288	0,304	0,296	1375,5
72	0,267	0,244	0,256	1173,0
73	0,365	0,419	0,392	1855,5
74	0,326	0,326	0,326	1525,5
75	0,354	0,336	0,345	1620,5
76	0,402	0,361	0,382	1803,0
77	0,374	0,435	0,405	1918,0
78	0,554	0,547	0,551	2648,0
79	0,619	0,559	0,589	2840,5
80	0,329	0,338	0,334	1563,0
81	0,396	0,357	0,377	1778,0
82	0,128	0,12	0,124	515,5
83	0,164	0,166	0,165	720,5
84	0,148	0,154	0,151	650,5
85	0,265	0,252	0,259	1188,0

AMOSTRA	ABS-1	ABS-2	MÉDIA	CONCENTRAÇÃO
86	0,151	0,158	0,155	668,0
87	0,109	0,102	0,106	423,0
88	0,048	0,05	0,049	140,5
89	0,18	0,185	0,183	808,0
90	0,338	0,312	0,325	1520,5
91	0,103	0,109	0,106	425,5
92	0,229	0,217	0,223	1010,5
93	0,18	0,167	0,174	763,0
94	0,522	0,466	0,494	2365,5
95	0,055	0,054	0,055	168,0
96	0,075	0,073	0,074	265,5
97	0,151	0,151	0,151	650,5
98	0,192	0,215	0,204	913,0
99	0,17	0,158	0,164	715,5
100	0,244	0,198	0,221	1000,5
101	0,418	0,358	0,388	1835,5
102	0,39	0,378	0,384	1815,5

ABS: absorbância, concentração em pg/mL.

ANEXO 10: Resultados dos testes rápidos para a malária das amostras de sangue dos indivíduos com malária grave.



ANEXO 11: Resultados dos testes rápidos para a malária das amostras de sangue dos indivíduos com malária grave.

